

TC.
KIRIKKALE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

POLİ(AKRİLAMİT-ko-AKRİLİK ASİT)
HİDROJELLERİNE LAKKAZ ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU

Göknil ŞAHİN

EKİM 2018

Kimya Anabilim Dalı Göknil ŞAHİN tarafından hazırlanan
POLİ(AKRİLAMİT-ko-AKRİLİK ASİT) HİDROJELLERİNE LAKKAZ
ENZİMİNİN İMMOBİLİZASYONU adlı Yüksek Lisans Tezinin Anabilim Dalı
standartlarına uygun olduğunu onaylarım.

Prof.Dr. Zeki ÖKTEM

Anabilim Dalı Başkanı

Bu tezi okuduğumu ve tezin **Yüksek Lisans Tezi** olarak bütün gereklilikleri
yerine getirdiğini onaylarım.

Dr. Öğr. Üyesi Haydar ALTINOK

Danışman

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Hayrettin TÜMTÜRK
Üye (Danışman) : Dr. Öğr. Üyesi Haydar ALTINOK
Üye : Dr. Öğr. Üyesi Murat İNAL

.../.../2018

Bu tez ile Kırıkkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu
Yüksek Lisans derecesini onaylamıştır.

Prof. Dr. RECEP ÇALIN

Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

ÖZET

POLİ(AKRİLAMİT-KO-AKRİLİK ASİT) HİDROJELLERİNE LAKKAZ ENZİMİ İMMOBİLİZASYONU

ŞAHİN, Göknıl

Kırıkkale Üniversitesi

Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi

Danışman: Dr. Öğretim Üyesi Haydar ALTINOK

Ekim 2018, 124 Sayfa

Bu çalışmada, Lakkaz enzimi (EC 1.10.3.2), poli(akrilamit-ko-akrilik asit) hidrojellerine, epiklorhidrin (ECH), N-hidroksisüksinimit (NHS) ve karbodiimide (CDI) ile aktifleştirilerek kovalent bağlanma yöntemiyle (P(AAm-ko-AAc)/ECH, P(AAm-ko-AAc)/CDI ve P(AAm-ko-AAc)/NHS) şeklinde immobilize edilmiştir. Serbest enzim için Michaelis-Menten sabiti (K_m) ve maksimum tepkime hızı ($V_{\max}$) değerleri sırası ile $8,69 \times 10^{-3}$ mM, $7,19 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu. Immobilize enzimler (P(AAm-ko-AAc)/ECH, P(AAm-ko-AAc)/NHS ve P(AAm-ko-AAc)/CDI için ise K_m değerleri $0,50 \times 10^{-3}$ mM, $1,17 \times 10^{-3}$ mM ve $7,35 \times 10^{-3}$ mM, $V_{\max}$ değerleri $0,85 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, $1,43 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, $4,65 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu. Serbest enzim ve immobilize enzimler (P(AAm-ko-AAc)/ECH, P(AAm-ko-AAc)/CDI ve P(AAm-ko-AAc)/NHS) için optimum pH değerleri sırasıyla 5,0-5,0-5,5 ve 5,5 ve optimum sıcaklık değerleri serbest enzim ve immobilize enzimler (P(AAm-ko-AAc)/ECH, P(AAm-ko-AAc)/CDI ve P(AAm-ko-AAc)/NHS) için sırasıyla 40°C ve 45°C olarak bulundu. Serbest enzim 64 gün sonunda 4 °C’ da aktifliğinin %29’ unu koruduğu gözlemlendi. P(AAm-ko-AAc)/ECH, P(AAm-ko-AAc)/CDI ve P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojellerine immobilize edilen lakkaz için sırasıyla 35. günde %51’ ini, 38. günde %66’ sını, 37. günde %69’ unu koruduğu gözlemlendi. Immobilize enzimlerin 5 kez kullanım sonunda ve enzim aktifliklerini %17-52 aralığında koruduğu bulundu. P(AAm-ko-AAc)/CDI ve P(AAm-ko-AAc)/NHS

hidrojellerine immobilize edilen lakkazlar için 40°C ve 50°C' da inaktivasyon sabitleri sırasıyla 0,0108-0,0165, 0,0190-0,0252 olarak bulundu. Serbest lakkazın 30°C' da 6 saat sonunda metil oranjin başlangıç rengini %31 oranında giderdiği gözlemlendi. P(AAm-ko-AAc)/ECH, P(AAm-ko-AAc)/CDI, P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojellerine immobilize edilen lakkazın ise sırasıyla %21, %29 ve %32 oranında giderdiği gözlemlendi.

Anahtar Kelimeler: Lakkaz, poli(akrilamit-ko-akrilik asit), epiklorhidrin, karbodiimit, N-Hidroksisüksinimit, enzim immobilizasyonu, kovalent bağlanma.

ABSTRACT

IMMOBILIZATION OF LACCASE ONTO POLY(ACRYLAMIDE-CO-ACRYLIC ACID) HYDROGELS

SAHIN, Goknil

Kırıkkale University

Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry, M.Sc. Thesis

Supervisor: Assist. Prof. Dr. Haydar ALTINOK

October 2018, 124 pages

In this study, Laccase (E.C 1.10.3.2) was covalently immobilized onto poly(acrylamide-co-acrylic acid) hydrogels by activating with epichlorohydrin (ECH), N-hydroxysuccinimide (NHS) and carbodiimide (CDI). Michaelis-Menten constant (K_m) and maximum reaction rate (V_{max}) values were found as $8,69 \times 10^{-3}$ mM, $7,19 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ for free enzyme, respectively. K_m and V_{max} values were found as $0,50 \times 10^{-3}$ mM, $1,17 \times 10^{-3}$ mM, $7,35 \times 10^{-3}$ mM and $0,85 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, $1,43 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, $4,65 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ for immobilized enzymes, respectively. Optimum pH were observed as 5,0 for free enzyme and 5,0-5,5 and 5,5 for P(AAm-co-AAc)/ECH, P(AAm-co-AAc)/CDI, P(AAm-co-AAc)/NHS immobilized enzymes. Optimum temperature were observed as 40°C and 45°C for free enzyme and immobilized enzymes, respectively. After 64 days of storage at 4°C free enzyme retained 29% of its original activity and immobilized enzymes, P(AAm-co-AAc)/ECH, P(AAm-co-AAc)/CDI, P(AAm-co-AAc)/NHS, were retained 51-69% of their original activities, after 35-37 days of storage at 4°C. Immobilized enzymes were used repeatedly 5 times, were retained 17-52% of their original activities. Inactivation rate constants (k_i) of immobilized enzymes, P(AAm-co-AAc)/CDI and P(AAm-co-AAc)/NHS, $0,0108-0,0165$ min⁻¹, $0,0190-0,0252$ min⁻¹. Percent decolorization of methyl orange by free enzyme and enzymes immobilized in P(AAm-co-

AAC)/ECH, P(AAm-co-AAC)/CDI, P(AAm-co-AAC)/NHS were found as 31% and 21%, 29%, 32%.

Key Words: Laccase, poly(acrylamide-co-acrylic acid), epichlorohydrin, N-hydroxysuccinimide, carbodiimide, enzyme immobilization, covalent bonding.



TEŞEKKÜR

Çalışmalarımın her aşamasında değerli bilgilerini benimle paylaşan, kullandığı her kelimenin hayatıma kattığı anlamı asla unutmayacağım, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle bana faydalı olmak için elinden gelenin fazlasını sunan, samimiyetini ve güler yüzünü benden esirgemeyen, değerli paylaşımlarını hayatım boyunca fazlasıyla kullanacağıma inandığım saygı değer danışman hocam Dr. Öğretim Üyesi Haydar ALTINOK'a

Tüm eğitimim hayatım boyunca benden maddi ve manevi desteklerini esirgemeyen, yaşamımın her evresinde yanımda olan sevgili annem Selma BAYRAKDAR'a ve babam Cengiz ELDOĞAN'a

Çalışmalarımda bana ümit ve destek olduğu için sevgili hayat arkadaşım, eşim Kenan ŞAHİN'e

Sürekli çalışmama izin verdiği için, evimizin mutluluk kaynağı can oğlum Osman Furkan ŞAHİN'e

Sonsuz teşekkürlerimi sunarım...

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	İii
TEŞEKKÜR	v
İÇİNDEKİLER	vi
ŞEKİLLERİN DİZİNİ	xi
ÇİZELGELERİN DİZİNİ	xiv
1. GİRİŞ	1
1.1. Hidrojeller.....	1
1.1.1Hidrojellerin Sınıflandırılması	2
1.2. Enzimler.....	5
1.2.1. Enzimlerin Kimyasal Doğası.....	5
1.2.2. Enzimlerin Adlandırılması ve Sınıflandırılması.....	6
1.2.3. Enzimatik Tepkimenin Hızını Etkileyen Faktörler.....	6
1.2.4. Enzimlerin Etki Mekanizması.....	9
1.2.5. Enzimlerin Kullanım Alanları.....	11
1.3. Enzim İmmobilizasyonu ve İmmobilizasyon Metodları.....	12
1.4. Enzim İmmobilizasyon Metodları.....	18
1.4.1. Kimyasal Metodlar.....	19
1.4.2. Fiziksel Metodlar.....	22
1.5. İmmobilizasyon Metodunun Belirlenmesi.....	23
1.6. Enzim, Substrat ve Destek Materyalinin Özellikleri.....	23
1.6.1. Lakkaz Enzimi ve Özellikleri.....	24
1.6.2. Siringaldazin.....	26
1.6.3. Destek materyali.....	26
1.7. Azo boyaları.....	27
1.8. Enzimatik Renk Giderme.....	28
1.9. Lakkazın İmmobilizasyonu ile İlgili Yapılan Çalışmalar.....	31

2. MATERYAL VE YÖNTEM.....	40
2.1. Kimyasallar.....	40
2.2. Cihazlar	43
2.3. Çözeltilerin Hazırlanışı	43
2.3.1. Sodyum Hidroksit Çözeltisi	43
2.3.2.Siringaldazin Çözeltisi	44
2.3.3. Sitrat Tamponu	44
2.3.4. Fosfat Tamponu.....	44
2.3.5. Lakkaz Çözeltileri.....	44
2.3.6. Sodyum Asetat Tamponu.....	45
2.3.7. Metil Oranj Çözeltisi	45
2.3.8. Karbodiimit Çözeltisi	45
2.3.9. N-Hidroksisüksinimit Çözeltisi	45
2.4. Siringaldazin Kalibrasyon Eğrisi ve Hazırlanışı	46
2.5. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle Enzim İmmobilizasyonu	47
2.5.1. Epiklorhidrin Kullanarak Enzim İmmobilizasyonu	47
2.5.2. Karbodiimit Kullanarak Enzim İmmobilizasyonu	48
2.5.3.N-hidroksisüksinimit Kullanarak Enzim İmmobilizasyonu	49
2.6.Aktiflik Tayini	51
2.6.1. Serbest Enzim Aktiflik Tayini	51
2.6.2.İmmobilize Enzim Aktiflik Tayini	51
2.7.Enzim Aktifliğine pH Etkisi	52
2.7.1.Serbest Enzim Aktifliğine pH Etkisi.....	52
2.7.2.İmmobilize Enzim Aktifliğine pH Etkisi.....	52
2.8.Enzim Aktifliğine Sıcaklık Etkisi.....	53
2.8.1.Serbest Enzim Aktifliğine Sıcaklık Etkisi.....	53
2.8.2.İmmobilize Enzim Aktifliğine Sıcaklık Etkisi.....	53
2.9.Enzim Aktifliğine Substrat Değişimi Etkisi.....	53
2.9.1.Serbest Enzim Aktifliğine Substrat Değişimi Etkisi.....	53
2.9.2.İmmobilize Enzim Aktifliğine Substrat Değişimi Etkisi....	54
2.10.Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi.....	54

2.10.1.Serbest Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi..	54
2.10.2.İmmobilize Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi.....	54
2.11.İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi.....	55
2.12. Enzim Aktifliğine Termal İnaktivasyon Etkisi	55
2.12.1. İmmobilize Enzim Aktifliğine Termal İnaktivasyon Etkisi	55
2.13. Enzim Aktifliği İle Metil Oranjin Renginin Giderilmesi.....	55
2.13.1. Serbest Enzim İle Metil Oranjin Renginin Giderilmesi	55
2.13.2. İmmobilize Enzim İle Metil Oranj Renginin Giderilmesi	56
3. ARAŞTIRMA BULGULARI	57
3.1.Serbest Enzim Aktifliğine pH Etkisi.....	57
3.2.İmmobilize Enzim Aktifliğine pH Etkisi.....	58
3.2.1. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Epiklorhidrin Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Aktifliğine pH Etkisi	58
3.2.2. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Karbodiimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Aktifliğine pH Etkisi	60
3.2.3. Poli(akrilamit-ko-akrilikasit)/N-Hidroksisüksinimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Aktifliğine pH Etkisi.....	61
3.3.Serbest Enzim Aktifliğine Sıcaklık Etkisi	63
3.4.İmmobilize Enzim Aktifliğine Sıcaklık Etkisi	64
3.4.1. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Epiklorhidrin Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Sıcaklık Etkisi..	64
3.4.2.Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Karbodiimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Sıcaklık Etkisi	66
3.4.3.Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/N-Hidroksisüksinimit Hidrojeline immobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Sıcaklık Etkisi	67
3.5.Serbest Enzim Aktifliğinde Substrat Değişimi Etkisi	69

3.6.İmmobilize Lakkaz Aktifliğine Substrat Değişimi Etkisi.....	71
3.6.1. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Epiklorhidrin Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Substrat değişimi Etkisi.....	71
3.6.2.Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Karbodiimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Substrat Değişimi Etkisi.....	73
3.6.3.Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/N-Hidroksisüksinimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Substrat Değişimi Etkisi	74
3.7.Serbest Enzimin Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi	76
3.8.İmmobilize Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi	78
3.8.1. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Epiklorhidrin Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi	78
3.8.2. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Karbodiimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi	80
3.8.3. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/N-Hidroksisüksinimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Depolam Süresinin Etkisi	81
3.9.İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısına Bağlı Değişimi	83
3.9.1.Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Epiklorhidrin Hidrojeline İmmobilizme Edilen Lakkaz Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi	83
3.9.2. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Karbodiimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi	84
3.9.3 Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/N-Hidroksisüksinimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi.....	86
3.10. İmmobilize Enzim Aktifliğinde Termal inaktivasyon Etkisi	87

3.11. Serbest Enzim İle Metil Oranj Renginin Giderilmesi	90
3.12. İmmobilize Enzim İle Metil Oranj Renginin Giderilmesi	92
3.12.1. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Epiklorhidrin Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz İle Metil Oranj Renginin Giderilmesi.....	92
3.12.2. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Karbodiimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz İle Metil Oranj Renginin Giderilmesi.....	94
3.12.3. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/N-Hidroksisüksinimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz İle Metil Oranj Renginin Giderilmesi.....	95
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	98
5. KAYNAKLAR.....	100

ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>Şekil</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Enzimatik Tepkimenin Hızına Substrat Derişiminin Etkisi	8
1.2. Enzime Substrat Bağlanmasında Anahtar-Kilit ve İndüklenmiş Uyum Hipotezi	11
1.3. İmmobilizasyon Şeması.....	18
1.4. İmmobilizasyon Metodu.....	19
1.5. Kovalent Bağlanma ile İmmobilizasyon.....	20
1.6. Çapraz Bağlanma ile İmmobilizasyon.....	21
1.7. Lakkaz Üreten Trametes versicolor Mantarı.....	24
1.8. Lakkazın İndirgenme-Yükseltgenme Mekanizması.....	25
1.9. Lakkaz ve Siringaldazin Tepkimesi.....	26
1.10. Lakkaz Enziminin Üç Boyutlu Yapısı.....	26
1.11. Metil Oranjın Yapısı.....	28
1.12. Metil Oranjın Lakkaz Varlığında Önerilen Bozunma Mekanizması.....	30
2.1. Siringaldazin Kalibrasyon Grafiğı.....	47
3.1. Serbest Lakkazın Maksimum Aktifliğinin pH ile Değışimi.....	58
3.2. P(AAm-ko-AAc)/ECH Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Enziminin Maksimum Aktifliğinin pH ile Değışimi.....	59
3.3. P(AAm-ko-AAc)/CDI Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Enziminin Maksimum Aktifliğinin pH ile Değışimi	61
3.4. P(AAm-ko-AAc)/NHS Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Enziminin Maksimum Aktifliğinin pH ile Değışimi	62
3.5. Serbest Lakkazın Maksimum Aktifliğinin Sıcaklık ile Değışimi	64
3.6. P(AAm-ko-AAc)/ECH Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğinin Sıcaklık ile Değışimi.....	65
3.7. P(AAm-ko-AAc)/CDI Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Maksimum Aktifliğinin Sıcaklık ile Değışimi.....	67

3.8.	P(AAm-ko-AAc)/NHS Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Maksimum Aktifliğinin Sıcaklık ile Değişimi.....	68
3.9.	Serbest Lakkaz için Lineweaver-Burk Grafiği.....	71
3.10.	P(AAm-ko-AAc)/ECH Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Lineweaver-Burk grafiği.....	72
3.11.	P(AAm-ko-AAc)/CDI Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Lineweaver-Burk Grafiği	74
3.12.	P(AAm-ko-AAc)/NHS Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Lineweaver-Burk Grafiği	75
3.13.	Serbest Lakkaz Maksimum Aktifliğinin Depolama Süresi ile Değişimi	77
3.14.	P(AAm-ko-AAc)/ECH Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Aktifliğinin Depolama Süresi ile Değişimi.....	79
3.15.	P(AAm-ko-AAc)/CDI Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Aktifliğinin Depolama Süresi ile Değişimi.....	81
3.16.	P(AAm-ko-AAc)/NHS Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Aktifliğinin Depolama Süresi ile Değişimi.....	82
3.17.	P(AAm-ko-AAc)/ECH Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Maksimum Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi	84
3.18.	P(AAm-ko-AAc)/CDI Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Maksimum Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi	85
3.19.	P(AAm-ko-AAc)/NHS Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Maksimum Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi	87
3.20.	40 °C' da P(AAm-ko-AAc)CDI için $\ln A_t - t$ Grafiği.....	88
3.21.	40 °C' da P(AAm-ko-AAc)NHS için $\ln A_t - t$ Grafiği.....	88
3.22.	50 °C' da P(AAm-ko-AAc)CDI için $\ln A_t - t$ Grafiği.....	89
3.23.	50 °C' da P(AAm-ko-AAc)NHS için $\ln A_t - t$ Grafiği.....	89
3.24.	Serbest Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilme Yüzdelерinin Zamanla Değişimi	91
3.25.	P(AAm-ko-AAc)/ECH Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilme Yüzdelерinin Zamanla Değişimi.....	93
3.26.	P(AAm-ko-AAc)/CDI Hidrojeline İmmobilize Edilen	

	Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilme Yüzdelерinin Zamanla Değişimi.....	96
3.27.	P(AAm-ko-AAc)/NHS Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilme Yüzdelерinin Zamanla Değişimi.....	96



ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>Çizelge</u>	<u>Sayfa</u>
1.1	Yaygın Olarak Kullanılan Destek Materyalleri..... 17
2.1.	Siringaldazin Derişimi ile Absorbansın Değişimi..... 46
3.1.	Serbest Lakkazın Aktifliğine pH Etkisi..... 57
3.2.	P(AAm-ko-AAc)/ECH Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine pH Etkisi 59
3.3.	P(AAm-ko-AAc)/CDI Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine pH Etkisi 60
3.4.	P(AAm-ko-AAc)/NHS Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine pH Etkisi 62
3.5.	Serbest Lakkazın Aktifliğine Sıcaklık Etkisi 63
3.6.	P(AAm-ko-AAc)/ECH Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Sıcaklık Etkisi 65
3.7.	P(AAm-ko-AAc)/CDI Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine sıcaklık etkisi 66
3.8.	P(AAm-ko-AAc)/NHS Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Sıcaklığın Etkisi 68
3.9.	Serbest Lakkaz Aktifliğine Substrat Derişimi Etkisi 70
3.10.	P(AAm-ko-AAc)/ECH Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Substrat Derişimi Etkisi 72
3.11.	P(AAm-ko-AAc)/CDI Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Substrat Derişimi Etkisi 73
3.12.	P(AAm-ko-AAc)/NHS Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Substrat Derişimi Etkisi 75
3.13.	Serbest Lakkaz ve İmmobilize Lakkazlar için Km ve Vmak Değerleri 76
3.14.	Serbest Lakkazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi 77
3.15.	P(AAm-ko-AAc)/ECH Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi 79
3.16.	P(AAm-ko-AAc)/CDI Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın

	Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi	80
3.17.	P(AAm-ko-AAc)/NHS Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi	82
3.18.	P(AAm-ko-AAc)/ECH Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi	83
3.19.	P(AAm-ko-AAc)/CDI Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi	85
3.20.	P(AAm-ko-AAc)/NHS Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi	86
3.21.	Serbest ve İmmobilize Lakkazlar için k _i Değerleri	90
3.22.	Serbest Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilme Yüzdeleri.....	91
3.23.	P(AAm-ko-AAc)/ECH Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilme Yüzdeleri.....	93
3.24.	P(AAm-ko-AAc)/CDI Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilme Yüzdeleri	94
3.25.	P(AAm-ko-AAc)/NHS Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz ile Metil Oranjın Renginin Giderilme Yüzdeleri	96

1.GİRİŞ

1.1. HİDROJELLER

Hidrojeller, su ortamında çözünmeye ihtiyaç duymadan şişebilen, çapraz-bağlı sisteme sahip polimerik ağ yapılarının üç boyutlusudur [1]. Hidrojinin çözünmemesi, yapısındaki kimyasal ya da fiziksel çapraz bağların sonucudur. Yapısına çok miktarda su almasıysa, suyu seven(hidrofilik) karakteri ve ağ şeklindeki yapısından kaynaklanır [2]. Hidrojeller jelatin, agar ve aljinatlar gibi hem doğal hem de sentetik polimerleri kapsamaktadır. Suda bir denge hacmine kadar şişerler fakat şekillerini korurlar. Hidrojellerin absorpladığı su miktarı oldukça büyüktür ve hatta kendi ağırlığının 1000 katına kadar ulaşabilir. Bu nedenle son yıllarda çok çeşitli alanlarda kullanılmaktadırlar [3].

Hidrojel Kullanım Alanları:

1. Karbon nanotüp muhteva eden hidrojeller sinyal iletimi sağlayan içinde nitroz oksit bulunan önemli biyosensörlerin üretiminde kullanılır.
2. Çapraz bağ yapmış nanoselüloz hidrojeller bakterilere karşı direnç gösterdiği ve bunun yanında sitotoksikite ve biyouyumlu karakter sergilediği için üretiminin ilk aşamasında yara pansumanı tedavisinde kullanılır.
3. Yaraları enfeksiyonlara karşı korur ve eğer yara nemli ise iyileşmesine olanak sağlar.
4. PHEMA (Polihidroksietil Metakrilat), eczacılıkta, kontrollü ilaç salım sistemlerde kullanılır [3].

Vücutta Hidrojel Kullanımını Sağlayan Etmenler:

- Vücut sıvılarına karşı az ya da çok geçirgen olduklarından besinler, oksijen gibi yararlı maddelerin geçişine engel oluşturmazlar.
- Çevredeki dokulara sürtünmesi azdır.
- Yumuşaktır.
- Mukoza zarı ve dokularla düşük yapışma gösterirler.
- Kuru hidrojeller bazı yollarla belli miktarda su absorplayabilirler. Bu aşırı miktardaki vücut sıvılarının atılmasında kullanılmaktadır.
- Şişmiş hidrojeldeki suyun bir kısmı polimer yapıda belli büyüklükteki moleküller (ilaçlar için gibi) için difüzyon yolları sağlar.
- Polimerik yapı büyük moleküller hücreler ve bakteriler için bariyer gibi davranmaktadır [2].

1.1.1. Hidrojel Sınıflandırılması

Polimerik hidrojeller, hazırlama metodlarına, fiziksel yapılarına, iyonik yüklerine ve çapraz bağlanma durumlarına, kaynaklarına, su içeriğine ve kimyasal aralıklarına bağlı olarak sınıflandırılabilirler [4].

- Hazırlanma metodlarına göre
 - Homopolimer H.
 - Kopolimer H.
 - Çoklu polimer H.
- Fiziksel yapılarına göre
 - Amorf H.
 - Yarı-kristalik H.
 - Hidrojen bağlı H.
- İyonik olma durumlarına göre
 - Nötr (iyonik olmayan) H.
 - İyonik (anyonik, katyonik, amfoterik) H.

- Çapraz bağlanma durumlarına göre

Fiziksel H.

Kimyasal H.

- Kaynaklarına göre

Doğal H.

Sentetik H.

- Su muhtevasına göre

Düşük şişme dereceli (20-50 %)

Orta şişme dereceli (50-90 %)

Yüksek şişme dereceli (90-99,5 %)

Süper absorbant ($\geq 99,5$ %)

- Kimyasal aralıklarına göre

Biyobozunur

Biyobozunmayan

Homopolimer Hidrojeller

Tek tip monomerden oluşurlar. Örnek olarak; Poli(2-hidroksi etil metakrilat)(PHEMA), poli(glisiril metakrilat), poli(3-hidroksi propil metakrilat) hidrojelleri verilebilir. Yumuşak kontak lens yapımı ve kontrollü ilaç salım aparatları gibi bazı uygulama alanları vardır.

Kopolimer Hidrojeller

İki komonomerin çapraz bağlanması sonucu meydana gelirler. Fakat en az bir tane monomer hidrofilik yapıda olmalıdır. Kopolimerik hidrojellerde çapraz bağlanma kovalent ya da iyonik olarak gerçekleşebilir.

Çoklu Polimer Hidrojeller

Monomer sayısı üç ya da daha fazla olan yapılardır. Örnek olarak sıcaklık ve pH'a duyarlı poli(N-izopropilakrilamit-ko-AA-ko-HEMA) hidrojeli verilebilir.

İyonik olmayan hidrojeller

Homopolimerik ve kopolimerik nötr hidrojellerin yapılarında yüklü gruplar mevcut değildir. Bu tür polimerler ortamdaki çözücünün ozmotik basıncı ya da zincirin gerilme enerjisi ile denge anına ulaştığında bu değere kadar şişerler. Çevre sıcaklığı bu hidrojellerin şişme ve büzüşme durumlarını etkileyen bir faktördür.

İyonik hidrojeller

İyon halindeki monomerler kullanılarak polielektrolit hidrojeller elde edilir. Bu Katyonik ya da anyonik olma durumları monomer yüklerinin pozitif ve negatif yüklenmesine bağlıdır. İyonik hidrojel ana zincirinde yüklenmiş yapıların bulunması dış tepkilere bağlılığı artırır.

Anyonik hidrojeller

Negatif yüklenmiş asit özellik gösteren veya anyonik monomerlerin homopolimer yapılarından ya da bir anyonik monomerle bir nötr monomerin kopolimer yapısından meydana gelirler. Bu polimerlerin, denge şişme hareketlerinde ani değişiklikler oluşmasına dış ortam pH'sı neden olur.

Katyonik hidrojeller

Pozitif yüklenmiş baz özellik gösteren veya katyonik monomerlerin homopolimer yapılarından ya da bir katyonik monomerle bir nötr monomerin kopolimer yapısından meydana gelirler. Bu polimerlerin üretiminde genelde

kullanılan monomerlerden bazıları aminoetil metakrilat ve türevleri, 4-vinil piridindir.

1.2. Enzimler

1.2.1. Enzimlerin Kimyasal Doğası

Protein yapıların özellikle biyolojik yönden önemli bir kısmı ferment olarak adlandırılan enzimlerdir. Enzimler, doğal olarak sadece canlılar tarafından sentezlenebilen ve yaşayan metabolizmalarda katalizör etkisi yapan biyolojik yapılardır. Enzim etkisiyle dönüşüme uğratılan maddelere substrat adı verilir [5,6].

Enzimlerin genel özellikleri aşağıda belirtilmiştir [7].

- Tepkime süresince tükenmezler veya değişime uğramazlar.
- Küçük miktarları reaksiyon aktifliği için yeterlidir.
- Bir kimyasal tepkimenin denge anına ulaşmasını hızlandırırlar, denge sabitini etkilemezler.
Enzimler substrattan üretilen ürün miktarını değiştirmeden tepkime hızını aktiflik enerjisini düşürerek arttırırlar. Bunu enzimler substrata bağlanarak Enzim-Sustrat (ES) kompleksi oluşturarak yaparlar.
- Genellikle protein yapısındadırlar. Kimileri, protein grubuna ek olarak kofaktörlere sahiptirler.
- Ürün oluşum hızını hücrenin ihtiyaçlarına göre ayarlamak için enzim aktivitesi düzenlenebilir.
- Enzimlerin çoğu, hücre içinde özel organellerde yerleşmiştir.

Tepkime substratı veya ürünleri, diğer tepkimelerden ayrılmış ve reaksiyon için uygun ortam ayarlanmış olur.

1.2.2. Enzim Adlandırması ve Sınıflandırması

Uluslararası Biyokimya Birliği (IUB)' ne göre enzimler kataliz ettiği kimyasal reaksiyon türüne ve reaksiyon metabolizmasına dayanılarak adlandırma ve sınıflandırma yapılmaktadır.

IUB sisteminin özellikleri aşağıda verilmiştir:

- Reaksiyon ve onları kataliz eden enzimler 6 sınıfa bölünürler:
 - 1.Oksidoredüktazlar
 - 2.Transferazlar
 - 3.Hidrolazlar
 - 4.Liyazlar
 - 5.İzomerazlar
 - 6.Ligazlar
- Enzim isminin iki parçası vardır. İlki substrat veya substratların adıdır; “-az” ile sonlanan ikincisi katalize olunan reaksiyon türünü gösterir.
- Çalışılan reaksiyonun yapısına ışık tutmak için ek bilgi gerektiği durumlarda parantez içinde verilebilir.
- Enzimlerin tümünde bir kod numarası (EC) vardır; bu numarada tepkime türünü 1. sayı, vericinin etkilediği grubu 2. sayı, alıcı olarak yararlanılan grubu 3. sayı ve adlandırılan enzimi 4. sayı belirlemektedir [7,8].

1.2.3. Enzimatik Tepkimenin Hızını Etkileyen Faktörler

Enzim aktifliği, önceden belirlenmiş zaman ve başlangıç koşullarında enzimin belirlenmiş miktarının etkisi ile değişime uğrayan substratın miktarıyla ölçülür.

Enzim aktivitesi aşağıdaki faktörlerle değişir: [9,10].

1. Sıcaklık
2. pH
3. Enzim konsantrasyonu
4. Substrat konsantrasyonu
5. Zaman
6. Aktivatörlerin etkisi
7. İnhibitörlerin Etkisi

Sıcaklık:

Enzimlerin tümünde en iyi çalıştıkları bir spesifik sıcaklık derecesi mevcuttur. Bu enzimin Optimum Sıcaklık Derecesidir. Optimum sıcaklığın üstünde enzimatik tepkimenin hızı azalır ve genellikle 60 °C' ye gelindiğinde enzimlerin çoğunda 3 boyutlu yapı bozulur.

pH:

Enzimlerin tümünde en iyi çalıştıkları bir spesifik pH derecesi vardır. Bu pH nın altında ve üstünde tepkime hızı düşer ve enzim denatüre olur. Sıcaklık ve substrat derişimine bağılı olarak pH derecesi de değişim gösterir. Enzimin maksimum aktiflik gösterdiği pH' ya o enzimin optimum pH 'sı adı verilir.

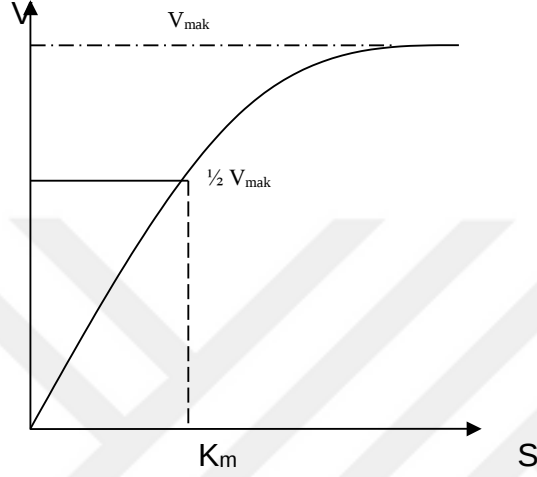
Enzim Konsantrasyonu:

Sabit tutulan substrat derişimine bağılı olarak, enzim derişimi arttırıldığında tepkime hızı da orantılı olarak artar. Çünkü enzim tanecikleri birbirinden bağımsız olarak çalışmaktadır.

Substrat Konsantrasyonu:

Sabit enzim derişiminde, enzimatik tepkimenin hızı belirli bir noktaya kadar lineer olarak substrat konsantrasyonu ile artar. Enzim substratına karşı

doğunluğa ulaştığında tepkime hızı değişmeden devam eder (Şekil 1.1). Bu durumda enzim maksimum hız ile çalışıyor demektir. Maksimum hız V_{mak} ile gösterilir. Enzim maksimum hız ile çalışırken enzim moleküllerinin yarısına bağlı substrat derişimine *Michaelis-Menten sabiti* (K_m) denilmektedir. Enzimin substratına ilgisi ne kadar fazla ise K_m değeri o kadar küçüktür.



Şekil 1.1. Enzimatik tepkimenin hızına substrat derişiminin etkisi

Zamanın etkisi:

Enzimatik reaksiyonun hızı belirli bir zamanda üretilen ürünün miktarı ile belirlenmektedir. Bir tepkimenin hızı kataliz edilen tepkime sürerken giderek düşer. Buna sebep reaksiyon devam ederken meydana gelen ürünlerin aralarında birleşerek aksi yönde bir reaksiyon oluşturmaları, enzimin zamanla aktifliğini kaybetmesi, tepkimeyi önleyen maddelerin ortaya çıkması ve substratın bitmesi gibi faktörlerdir. Bu faktörlerin etkilerinin ortadan kaldırılması için enzim çalışmaları genellikle substratın yaklaşık % 10' unun kullanıldığı reaksiyonun başlangıç kısmında gerçekleştirilir.

Aktivatörlerin Etkisi:

Başlıca metal iyonları (Ca^{++} , Fe^{++} , Mo^{++} , Mg^{++} , Mn^{++} ve Cu^{++}) nın az miktarları bazı enzim aktivasyonları için gereklidir. Metal iyonları enzimler ile bir kompleks meydana getirir ve bu kompleks diyalizle küçük partiküllere ayrılabilir. Bunun sonucunda enzim aktivitesi kaybolur. Yukarıda sayılan iyonlar ortama ilave edilirse enzim yeniden aktive olur ve tepkime devam eder.

İnhibitörlerin Etkisi:

Bu maddeler, enzimatik reaksiyonların hızını azaltır veya yok ederler. İnhibitör maddeler substratın enzimin aktif bölgesine bağlanmasını ve bunun sonucunda enzim-substrat kompleksinin oluşmasını engeller.

1.2.4. Enzimlerin Etki Mekanizması

Enzim etkisi iki şekilde incelenir. Birincisi reaksiyon boyunca gerçekleşen enerji değişimlerinin, diğeri ise kataliz esnasında aktif kısımda yapısal değişimlerin incelenmesine bağlıdır.

Aktivasyon Enerjisi:

Tanecikler arasında tepkime gerçekleşebilmesi için dış kaynaklı enerjiye ihtiyaç duyulur. Kimyasal reaksiyonların tümünde aktivasyon enerjisi olarak bir enerji basamağının atlanması gerekmektedir. Tepkime hızını belirleyen en önemli etken aktivasyon enerjisi, E_a ihtiyacının büyüklüğüdür. Enerji basamağı arttıkça birim zamanda bu basamağı aşan taneciklerin sayısı da o oranda azalacaktır. Tepkime hızını artırabilmek için ortama kimyasal veya biyolojik bir katalizör eklenebilir. Böylece katalizör substrat ile ES kompleksi oluşturarak aktivasyon enerjisi aşağı çekilir.

ES kompleksinin meydana gelmesi ile aktivasyon enerji basamağını aşan substrat miktarı daha fazladır, reaksiyon hızının artışına bağlı olarak birim zamanda oluşan ürün miktarı artmaktadır. Tepkime bitiminde serbest kalan enzim ortamdaki diğer substrat taneciklerine bağlanarak onların da aktivasyon enerjisini aşağı çeker ve onların da ürün oluşum hızını artırır.

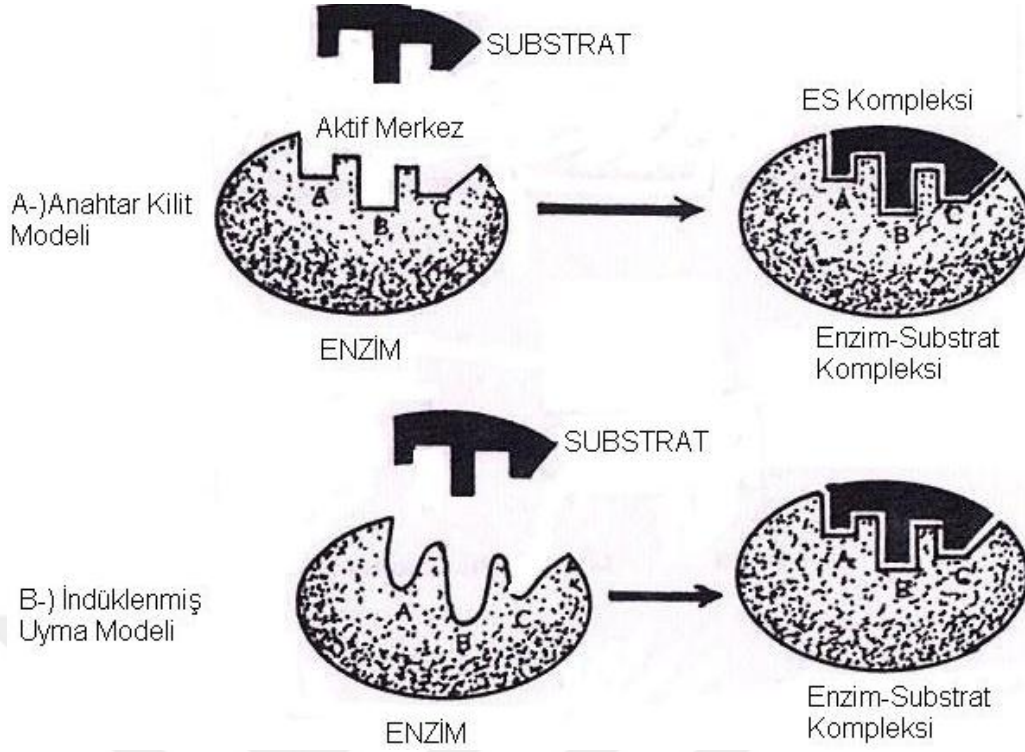
Düşük aktivasyon enerjisi gerektiren alternatif yollar oluşturarak enzimler hücre ortamında tepkimelerin gerçekleşmesini sağlamaktadır. Enzimle katalizlenen tepkimelerin çoğu katalizlenmeyen tepkimelere göre 10^3 ve 10^8 arasında daha hızlı olarak meydana gelir. Bir enzim taneciği saniyede 100-1.000 substrat taneciğini ürüne çevirebilmektedir [11].

Enzimlerin Aktif Merkezi:

Enzimler büyük moleküler yapıdayken substratlar tam tersi küçük moleküllerdir. Enzimin küçük bir bölgesi substrat ile ES kompleksinin oluşuna izin veren kısım yani aktif merkezdir. Enzimlerde kofaktör ve koenzimlerin de bulunduğu substrat bağlandığı enzim etkisiyle değişikliğe uğratıldığı ve yeni bir bileşiğe dönüştürüldüğü kısma Aktif Merkez denir.

Aktif merkez, bir enzimin substrata etki ettiği bölge, bir de kataliz olayının meydana geldiği bölge (katalitik alan) olmak üzere iki bölümden oluşur.

Substrat ve aktif merkez bir anahtar-kilit uyumu gösterirler. Enzim substrat ile karşılaştıktan sonra özel bir durum almakta ve substrat aktif bölgeye bağlanmaktadır. Bu olaya indüklenmiş-uyum hipotezi denir. Anahtar-kilit ve indüklenmiş-uyum hipotezini anlatan model şekil 1.2' de verilmiştir [12,13,14].



Şekil 1.2. Enzime substrat bağlanmasında anahtar-kilit ve indüklenmiş uyum hipotezi

1.2.5. Enzimlerin Kullanım Alanları

Enzimler özel olmaları ve en ufak konsantrasyonlarda bile substrat reaksiyonlarını aktive etmelerinden dolayı sanayide kullanımı geniş bir sahaya yayılmıştır.

Endüstride enzimlerin neredeyse %30-35'i deterjan sanayisinde kullanılır. Kıyafetelerden protein kirlerinin yok edilmesinde proteazlar, inatçı nişasta kirlerinin temizlenmesinde amilazlar, yağ sökücü olarak lipazlar, çamaşırları yumuşatmada selülazlar kullanılmaktadır.

Enzimlerden ilaç, çevre, gıda, kâğıt, tekstil, tarım, hayvancılık gibi birçok alanda faydalanılmaktadır. Biyoteknolojik gelişmeler enzimlerin uygulama alanı arttırmıştır.

Enzimlerin yaklaşık %20-25'i nişasta sektöründe kullanılır. Bebekler için tripsin, amilaz, glikoz, nişastadan glikoz ve çeşitli şuruplar eldesinde kullanılır.

Enzimlerin yaklaşık %20'si süt sektöründe kullanılmaktadır. Peynir üretiminde rennin, mavi küflü rokfor peynirinin üretimi sürecinde peynirin olgunlaşmasında lipazlar, laktozdan glukoz ve galaktoz eldesinde laktaz kullanılır.

Berraklaştırma işlemi sırasında meyve suyu sanayide selülazlar ve pektinazlar kullanılır.

Unlu mamüller yapımında fungal alfa-amilaz enzimleri kullanılır.

Biyoyakıt sektöründe, selülazlar selülozik etanol elde etmek ve selülozu fermente edilebilir şekerlere indirgemek için kullanılır.

Kâğıt sanayisinde, amilaz, ksilanaz, selülaz ve ligninazlar kullanılır.

Genetik, farmakoloji, tarım ve tıpta restriksiyon enzimleri, DNA ligaz ve polimerazlar DNA'nın manipülasyonu için kullanılır.

Tekstilde dokumadan önce nişasta suyuna batırılan ipliklerden nişastanın giderilmesinde bakteriyel amilaz kullanılır.

Tıpta, tripsin kan pıhtılarının yok edilmesinde ve yara dezenfeksiyonunda kullanılmaktadırlar [15,16]

1.3. Enzim İmmobilizasyonu ve İmmobilizasyon Metodları

Enzimlerin, reaksiyonları özel ve hızlı bir şekilde aktifleştirmeleri bilim adamlarında onları canlı ortam dışında da kullanılabilir düşüncesi uyandırdı. Bu alanda 1926 yılında Sumner tarafından üreaz enzimi kristal halde elde edilerek ilk çalışma yapılmıştır. Devam eden süreçte birçok enzim çeşitli

kaynaklardan elde edilmiş ve oldukça saf preparatlar şeklinde ve çoğu kristalize bir şekilde piyasaya sürülmüştür.

Bazı özel ve maliyeti yüksek teknikler ile ancak enzimler saflaştırılabildiği için oldukça pahalıya mal olmaktadır. Serbest haldeki enzimin inaktif olmadan istenildiği anda tepkimeden giderilmesi de oldukça güçtür. Böylece pahalı enzimler tekrar tekrar kullanılamaz hale gelir. Bu tür ekonomik sıkıntılardan dolayı serbest enzim yerine hapsedilmiş enzim aktiveleştirilmesinin daha uygun olacağı düşünülmüş ve bu amaçla hapsedilmiş enzim mekanizmaları hazırlanmış ve teknolojiye kullanımı önemli hale gelmiştir [17].

İmmobilizasyon, "hapsedilmiş, kısıtlı hareket sistemine sahip, çözünmez hale getirilmiş " demektir. Enzimlerin ve mikroorganizmaların fiziksel ve kimyasal metodlarla kataliz yeteneğini koruyarak, devamlı ve bozunmadan kullanımını sağlamak amacıyla organik veya anorganik taşıyıcılara tutturulmasıdır [17,18].

Sulu ortamda çözünemeyen bir matrikse bağlandıklarında enzimler, matriksin içine hapsedildiklerinde veya kataliz yetenekleri yok olmadan birbirlerine bağlandıklarında immobilizasyon gerçekleşir. Kullanılan yöntem ve matriksin yapısına bağlı olarak immobilize enzimlerin özellikleri değişebilir.

İmmobilizasyon ile:

1. Enzimin optimum pH' ı değişebilir.
2. K_m değeri işleminden etkilenebilir.
3. Enzimin optimum sıcaklığında artış meydana gelebilir.
4. Matriks enzim için yeni bir ortam oluşturduğunda enzimin aktif kısmı değişikliğe uğrama veya matriks substratın hareketini engelleme durumları meydana gelebilir [19].

Enzim Taneciklerinin Hapsedilme işlemi :

1. Sulu ortamda çözünmeyen polimere enzimin kovalent bağ yapması
2. Su içerisinde çözünmeyen organik veya anorganik desteklerde adsorpsiyonu
3. Su içerisinde çözünmeden kalan jel matrisler veya yarı geçirgen mikrokapsüller içinde hapsedilerek yapılmaktadır. Her koşulda enzimin yer edinebilmesi için suda çözünmeyen bir materyal gereklidir [19].

İmmobilizasyon tekniği son zamanlarda önemli hale gelmiş ve uygulanabilirlik alanı artmıştır. Bu alanlar içerisinde ilaç, protein, mikroorganizma, bitki ya da hayvan hücrelerinde yüksek düzeylerde hapsedilip yapay organ sistemleri biyosensör ve reaktör uygulamaları ile kontrollü ilaç salınım sistemleri sayılabilir.

İlk immobilizasyon çalışması adsorpsiyon yöntemi ile gerçekleştirilerek 1916 yılında Nelson ve Griftin tarafından tarihe geçmiştir. Modern çağda ise ilk çalışma bazı immobilize enzim türevleri hazırlanarak kinetik parametrelerin incelenmesi Grubhofer ve Schleith tarafından 1954 yılında yapılmıştır. İlerleyen zamanlarda ise bu immobilizasyon yöntemi ünlenecek şekilde uygulanmaya devam edilmiştir [13].

Modifiye enzimlerin isimlendirilmesi 1971 yılında yapılan 3.Biyoteknoloji Biyomühendislik Sempozyumu ve 1.Enzim Mühendisliği Konferansında “immobilize enzim” kavramı öne sürülerek kabul edilmiştir. Immobilize enzim genel bir isim olup hepsini ifade ederken “hapsedilmiş“, “çözünemeyen“, “bağ yapmış“ gibi kavramlar sadece alt bir immobilizasyon şeklini belirtmektedir [19].

Enzim immobilizasyonu sırasında aktif merkezin işlemde etki görmemesi gerekmektedir. Aktif merkezdeki bulunan bölgelerden biri katalitik merkez diğeri ise substrat özelliği sağlayan kısımdır.İmmobilizasyon işleminin etkili bir şekilde gerçekleşmesi için enzimin yapısının çok iyi bilinmesi gerekir.

Enzim ile destek arasında bir etkileşim varsa, bu etkinin aktif merkez üzerinde gerçekleşmeyeceği destekler seçilmeli veya immobilizasyon işlemi sırasında aktif merkez korunmalıdır. Koruma görevi bazen kompetitif inhibitör tarafından sağlanır. İmmobilizasyon işleminin gerçekleştiği koşullar ılıman olmalıdır. Basıncın yüksek olması, kuvvetli asidik veya bazik ortam, organik çözücüler veya yüksek tuz derişimi ile gerçekleşen işlemlerde denatürasyona ve aktiflik kaybına neden olur [19].

İmmobilizasyon Metodu Seçiminde :

- Güvenilir olması
 - Enzim aktifliğinin korunması
 - Maliyet
 - İmmobilize enzimin kararlılığı
- dikkat edilmesi gereken 4 ana husustur.

Destek seçiminde ise, immobilizasyon yöntemi, birim hacimdeki aktiflik ve istenen mekanik özelliklere dikkat edilir. İyonik veya kovalent bağlanma ile meydana gelen immobilizasyon işlemlerinde desteğin fonksiyonel gruplar içermesi mecburidir. Yüklenmiş destek materyallerin kullanılması enzimin optimum pH' sının 1-2 birim, K_m değerinin ise 10 katı kadar değişimine neden olabilir. Substrat büyükse hapsetme metodu ve poröz destekler seçilmemelidir. Gözeneksiz destekler için enzim aktifliği, destek taneciğinin dış yüzeyi ile orantılıdır [20].

İmmobilize Enzimlerin Avantajları: [19,21].

İmmobilize Enzimler;

1. Reaksiyon ortamından kolaylıkla giderilebilirler. (süzme, santrifüjleme gibi) ve ürünlerin enzim tarafından kirletilmesi gibi bir problem yaratmaz.
2. Dış ortamın etkilerine (pH, sıcaklık vb.) karşı dayanıklıdır.
3. Uzun süre ve tekrar tekrar kullanılabilirler.
4. Doğal enzimlere göre daha kararlıdır.

5. Ürün eldesi kontrol altında tutulabilir.
6. Birbirini izleyen çok adımlı tepkimeler için uygundurlar.
7. Bazen serbest enzimden daha yüksek bir aktiflik gösterebilirler.
8. Kendi kendini parçalama etkisi nadiren gösterirler.

İmmobilize Enzimin Dezavantajları: [22].

- İmmobilizasyon işlemi süresince enzim etkinliği azalabilir veya kaybolabilir.
- Çok basamaklı immobilizasyon işlemlerinde enzim kararlılığı sınırlıdır.
- Enzim destek materyalinin maliyeti yüksektir.

İmmobilizasyon işleminde enzimlere uygun destek materyalinin seçimi ciddi önem taşır. Destek seçiminde tanecik büyüklüğü, toplam yüzey, hidrofilik grupların hidrofobik gruplara oranı ve destek materyalin kimyasal yapısı gibi noktalar esas alınır. Enzimin bağlanma yüzdesini ve immobilizasyon işlemi sonrasında enzimin aktifliği desteğin yapısına bağlıdır. Genel olarak desteğin hidrofilik özelliği ve etki yüzeyinde artış oldukça birim desteğe düşen enzim miktarında da artış olur.

İmmobilizasyon işleminde kullanılan en yaygın destek materyalleri Çizelge 1.1.'de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Yaygın olarak kullanılan destek materyalleri

İnorganik	Doğal Polimerler	Sentetik Polimerler
Kil, cam	Selüloz	Polistiren türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamitler
Bentonit	Dekstran	Naylonlar
Hidroksiapatit	Agar ve agaroz	Vinil ve alil polimerleri
Titandioksit	Karragenan	Oksiranlar
Zirkonyumdioksit	Kollojen	Metakrilat polimerleri
Nikeloksit	Kitin ve kitosan	İyon değiştirici reçineler
Ponza taşı	Jelatin	Maleik anhidrit polimerleri
Aktif karbon	Albümin	
Metaller	İpek	
Metal oksitler	Aljinat	

Enzimlerin immobilizasyonunda doğal veya yapay birçok organik ve inorganik maddeler kullanılmaktadır. Destek membran, sulu ortamda çözünmeden kalan katı veya polimer olabilir.

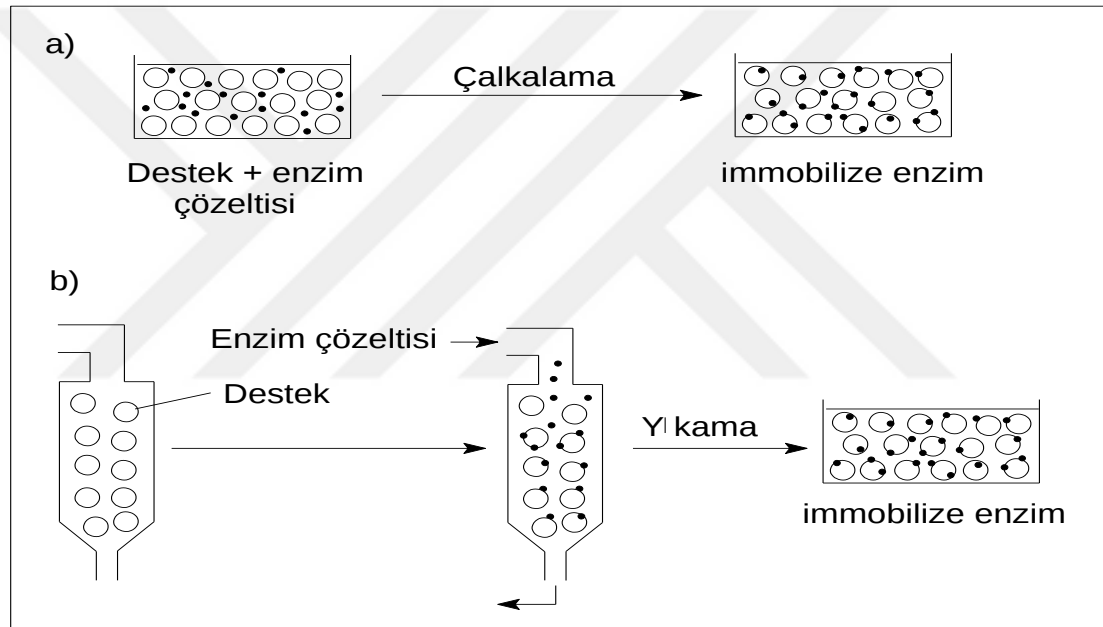
Destek materyalde olması gereken özellikler aşağıda verilmiştir: [21,23].

- Hidrofilik özellik
- Suda çözünmeme
- Gözenekli (poröz) yapı
- Mekanik kararlılık ve uygun partikül formu
- Kimyasal ve termal kararlılık
- Mikroorganizmalara karşı dirençlilik

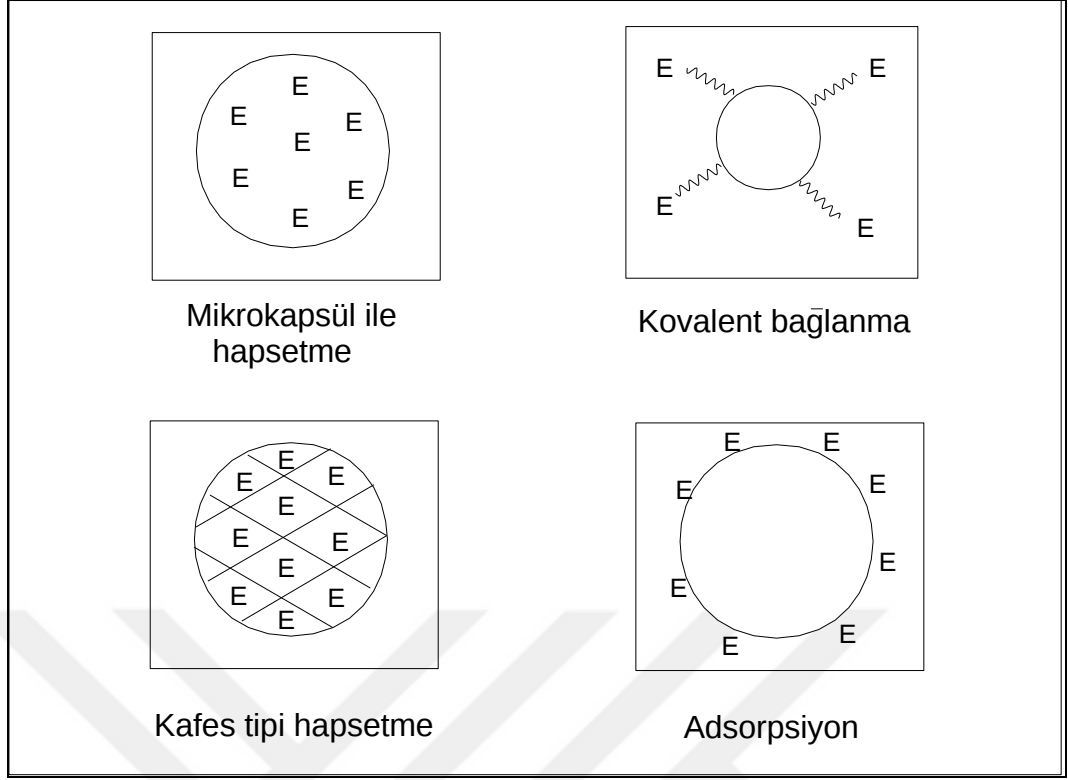
- Zehirsizlik
- Rejenere olabilme

1.4. Enzim İmmobilizasyon Metodları

Enzimlerin immobilizasyonu değişik yöntemler kullanılarak yapılır. İmmobilizasyon şeması ve metodları Şekil 1.3' de ve Şekil 1.4' de verilmiştir. Kimyasal ve fiziksel olarak immobilizasyon yöntemleri sınıflandırılabilir.



Şekil 1.3. İmmobilizasyon şeması



Şekil 1.4. İmmobilizasyon metodu

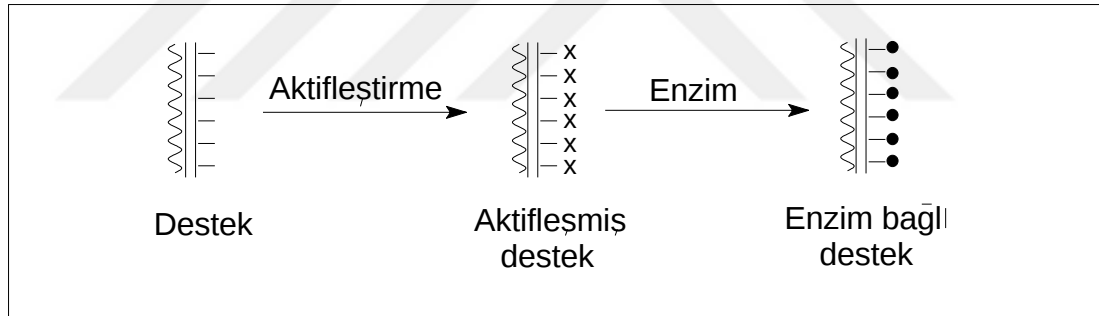
1.4.1. Kimyasal Metodlar

Su içerisinde çözünmeden aktif hale getirilmiş materyal ile enzim arasında kovalent bağlanma veya enzim tanecikleri arasında çapraz bağlanma ile kimyasal immobilizasyon gerçekleşir. Kimyasal işlemler genelde tersinmezdir. Serbest enzim immobilizasyon sonunda tekrar oluşturulamaz [24,25]. Bu yöntemde immobilize olmuş enzim kararlı olma, destek maddesi dayanıklı olma gibi artıları vardır. İmmobilizasyon işlem veriminin sınırdan kalması, reaksiyon koşullarının önemli olması, kimyasal yönden inaktif olan destek materyaline uygulanamaması gibi bazı eksileri de vardır [26]. Kimyasal metodlar kovalent ve çapraz bağlanma ile immobilizasyon olarak iki gruba ayrılır.

Kovalent Bağlanma

Sık kullanılan bir yöntem olan Kovalent Bağlanma, enzim ile su içinde çözünmeden aktif hale getirilmiş destek materyali arasında olur. Böylece enzim çeşitleri daha kararlı olur ve enzim çözelti ortamına geçemez [25]. Enzimin iç yapısı ve fonksiyonel grupları belli olduğu durumlarda kullanılan bağlanma yöntemidir. Enzimin karakteri, aktif uç yapısı, pH, sıcaklık ve organik çözücüler gibi faktörlerin etkisi altında bir yöntemdir [27,28].

Taşıyıcı maddenin şekil ve hacmine, aktifleşme metoduna, enzim yapısına ve tepkime esnasındaki özel koşullara bağlıdır. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon iki basamakta meydana gelir. Birinci basamak destek materyalinin aktif hale getirilmesi, ikinci basamak enzimin kovalent bağ yapmasıdır (Şekil 1.5.). Destek materyali; hidroksil, karboksil, amino, tiyol gibi fonksiyonel gruplar içermelidir [29].

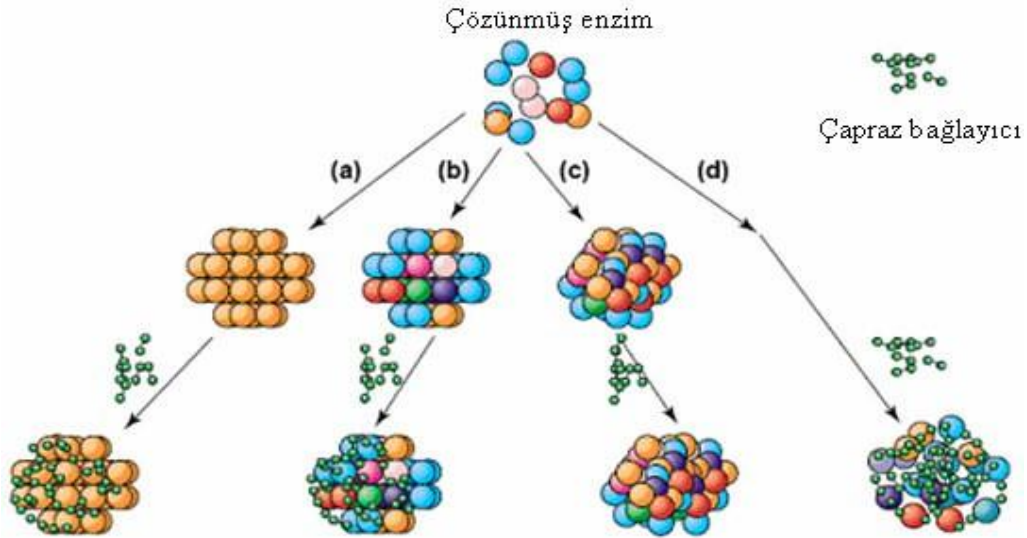


Şekil 1.5. Kovalent bağlanma ile immobilizasyon

Metodun en büyük artısı, oluşan bağların kuvvetli olması sebebiyle çeşitli ortamda kullanılması ve enzim destek maddesi üzerinde yer aldığından substrat ile temasının kolay olmasıdır. Metodun eksisi ise destek maddesi ile enzimde sıkı etkileşimin enzimin doğal yapısını bozmasıdır.

Çapraz Bağlanma

Enzim taneciklerinde herhangi bir destek materyaline ihtiyaç duyulmadan kendi aralarında moleküller arasında çapraz bağ yaparak immobilizasyon gerçekleşir. Metod üç boyutlu çapraz bağ yapmış enzim oluşum temeline dayanır [30]. Enzim etkinliği, reaksiyon zamanı, sıcaklık, iyon şiddeti, pH, çapraz bağ yapıcı madde ve enzim konsantrasyonu gibi faktörlere ve aralarındaki dengeye dayanır. Bu yöntemin artısı, bir seferde enzim immobilizasyonu için iki ya da daha fazla fonksiyonlu materyalin kullanılmasına izin vermesidir. Bu yöntemin eksisi ise yüksek etkinlik gösteren immobilize olmuş enzimin eldesi için moleküller arası çapraz bağ tepkimesinin kontrolündeki zorluklardır. Diazobenzidin, 1,5-diflor-2-4-dinitro benzen, glutaraldehit, triklor-s-triazin, hekzametilen diizosiyanat ve 2,4-diizotiyosiyano-toluen çapraz bağ yapıcı madde olarak enzim immobilizasyonunda kullanılan çok fonksiyonlu maddelerdir [31].



Şekil 1.6. Çapraz bağlanma ile immobilizasyon

1.4.2. Fiziksel Metodlar

Kovalent bağlanmaya ihtiyaç duymadan enzimin belirli bir yere tutturulması ile gerçekleşen yöntemlerdir. Enzim immobilizasyonu elektrostatik, protein-protein etkileşmesi, iyonik bağların oluşumu gibi bazı fiziksel kuvvetlerin etkileşmesi sonucu enzimin destek materyalindeki mikrokısımlar içinde veya gözenekli membranlarda tutturulması ile gerçekleşir. Temelde fiziksel metodlar tamamen tersinirdir. Ancak bazı özel durumlarda tersinmez bağ oluşumları da meydana gelir.

Fiziksel metodlar adsorpsiyon ve hapsedme ile immobilizasyon olarak iki gruba ayrılır.

Adsorpsiyon Metodu

Adsorpsiyon metodu hem basit hem de tarihi eskiye dayanan bir immobilizasyon metodudur [26,32]. Bu yöntemde enzim immobilizasyonu katı matriks üzerinde enzimin fiziksel adsorpsiyonuna veya iyonik bağlanması ile gerçekleşir. Hidrojen bağları, Van der Waals kuvvetleri ve hidrofobik etkileşmeler fiziksel adsorpsiyon yönteminde immobilizasyon işleminden sorumlu kuvvetlerdir [33]. İyonik bağlanmada proteinin iyon kısımları ile destek maddesinin zıt yükleri arasındaki çekimden oluşan kuvvetlere dayanır. Enzimin su içerisinde çözünmeden kalan maddelerde adsorpsiyonu ise pH, çözücü özellikleri, iyon şiddeti, protein ve adsorbanın konsantrasyonu, sıcaklık gibi deneysel şartlara dayanır. Yöntemin tersinir olması destek materyalinin ve enzimin tekrar kullanımına olanak sağlar [34].

Hapsedme Metodu

Enzimin polimerik matriks içerisine ya da yarı geçirgen membranlarda hapsedilmesi ile gerçekleşir [35]. Enzim sulu monomer veya polimer çözeltisinde çözülür. Hidrofilik polimer içerisine çapraz bağlanma, gama ışını veya UV ışınlarıyla başlatılan tepkime ile enzim hapsedilir [35,36]. Genelde

bu metod ile her türlü enzim, başka biyokatalizörler, tüm hücreler ve irili-ufaklı mikroorganizmalar hapsedilebilir [29].

1.5. İmmobilizasyon Metodunun Belirlenmesi

Enzimin bağ yapacağı destek maddesinin yapısı immobilizasyon metodunun belirlenmesinde önemlidir [37].

Etkin bir immobilizasyon gerçekleşmesi için şu faktörlere dikkat edilmelidir: [38].

1. Desteğin mekanik spesifikliği ve kararlılığı, fiziksel şekli uygun seçilmelidir.
2. Reaksiyon koşullarında enzim aktif olmalıdır.
3. Çapraz bağ yapan aktifleştirciler, enzimin aktif bölgesi ile reaksiyon vermemelidir.
4. Enzimin etkin ucu koruma altına alınmalıdır.
5. İmmobilizasyon sırasında, bağ yapmamış enzimleri ortamdan yok etmek için yapılan yıkama enzime zarar vermemelidir.
6. İmmobilize enzim, kimyasal reaksiyonlarda artık katalizör olarak kullanılmaya devam edilecekse immobilizasyon metodu seçilirken tepkimenin kimliğine de dikkat etmek gerekir.

1.6. Deneysel Çalışmada Kullanılan Enzim, Substrat ve Destek Materyalinin Özellikleri

Çalışma süresince lakkaz enzimi, siringaldazin sustratı, yarı-ağ yapılı hidrojel (yarı-IPN) destek materyali ve renk gideriminde metil oranj boyası kullanılmıştır.

1.6.1. Lakkaz Enzimi ve Özellikleri

Polyporaceae grubuna, *Trametes versicolor* veya *Coriolus versicolor*, ait mantarlar lakkaz enziminin üretiminde aktiftirler. Polyporaceae grubu mantarların ince tüylü yüzeyleri vardır ve çevrenin durumuna göre farklı renk alırlar. İlkbahar ve sonbaharda ağaç kütüklerinde çıkan bu mantarlar hindi kuyruğuna benzer yapıda olup dünya çapında odun çürütücüsüdürler. (Şekil 1.7) [39].



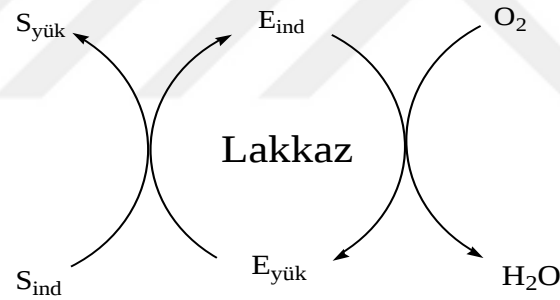
Şekil 1.7. Lakkaz üreten *Trametes versicolor* mantarı

Rengi beyaz olan çürükçül mantarlardan, *Trametes versicolor* E.C.1.10.3.2., elde edilen lakkaz, her molekülünde dört bakır iyonu olan bir çeşit oksidoredüktazdır. Yapısında 500' e yakın amino asit olup çoğunun 55-85 kDa moleküler ağırlığı vardır. Bilinen en eski enzimlerden biri olan lakkaz, 1883 yılında Yoshida tarafından, *Rhus vernicifera*'nın öz suyundan ilk defa izole edilmiştir. 3,0-7,5 arasında optimum pH ve 40-80°C arasında optimum

sıcaklık değerlerine sahiptir. Lakkazın sahip olduğu optimum pH değeri çalışmadaki substrat çeşitine göre değişmektedir. Lakkaz redoks mekanizmalarındaki enzim sınıflarının bir altında yer alır [40,41].

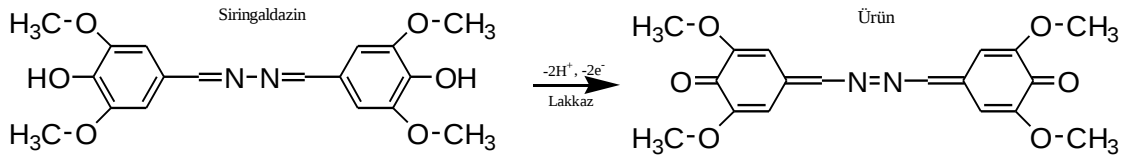
Lakkaz enziminin üretimi bakteri, böcek, yüksek yapıda bitkiler ve mantarlardan yapılmaktadır.

Enzim kaynağına bağlı olarak, mol kütlesi, maksimum pH, substrat spesifikliğı çeşitlendirilmiş türler elde edilebilir. Lakkaz enzimi, yapı olarak glikoproteindir. Enzimde karbonhidrat ağırlıkça %15-45 arasındadır. Lakkaz heksozamin, glikoz, mannoz, galaktoz, früktoz ve arabinoz karbonhidratlarını ihtiva eder [41,42]. Lakkaz enzimi, oksijen molekülünün suya indirgenmesini katalizlerken aromatik substratı da aynı zamanda oksitler (Şekil 1.8.) [43]. Lakkazın etkin kısmında hidratlanmış elektron, oksijen ve çeşitli türlerde bakır atomları vardır.

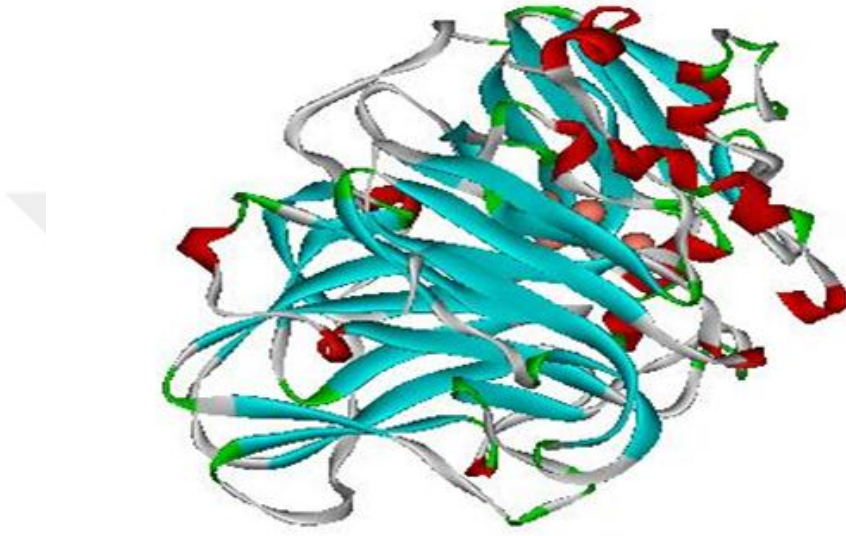


Şekil 1.8. Lakkazın indirgenme-yükseltgenme mekanizması

Substrat çeşitleri olarak siringaldazin, 4-benzendiol, naftol, diklorofenol, metoksifenol, askorbat, pirogallol, kresol, vb. türevleri lakkaz enzimi ile reaksiyon vermektedir [44]. Lakkaz enzimi ile oksitlenebilen diğer substrat grupları olarak fenoller, amino fenoller ve aromatik diaminler verilebilir [45]. Aşağıda Şekil 1.9' da lakkaz enzimi ile siringaldazinin verdiği reaksiyon ve ürünler verilmiştir [46]. Şekil 1.10' da *Trametes versicolor*'dan X-ışınları kristalografisiyle üretilen lakkazın üç boyutlu yapısı verilmiştir [47].



Şekil 1.9. Lakkaz ve siringaldazin tepkimesi



Şekil 1.10. Lakkaz enziminin üç boyutlu yapısı

1.6.2. Siringaldazin

Molekül kütlesi 360,3 g/mol olan siringaldazin (4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehit azin) $\text{C}_{18}\text{H}_{20}\text{N}_2\text{O}_6$ kapalı formülüne sahiptir. Genelde fenoller, amino fenoller ve aromatik diaminler ile yapısal özellik bakımından benzediği lakkaz enzimi ile oksitlenmesi oldukça kolaydır [45].

1.6.3. Destek materyali

Yapay veya doğal iki bileşenin en az birinin diğeri varlığında çapraz bağlı olduğu IPN'ler ilk kez Millar tarafından ortaya atılan iç içe geçmiş ağ yapılı

(interpenetrating network, IPN) sistemlerdir [48]. Polimer bileşenlerin aralarındaki uyumun derecesini arttırmak için mükemmel bir yoldur. Uygulamada makromoleküler yapıdaki benzerine göre bir IPN daha fazla performansa sahiptir [49].

Basamaklar halinde gerçekleşen IPN üreteiminin ilk aşamasında, birinci monomer çapraz bağlanır ve devamında çapraz bağlanmış yapı; ikinci monomer, monomer başlatıcısı ve çapraz bağlayıcısı eşliğinde şişerken ikinci monomer polimerleşir. Aynı zamanlı meydana gelen IPN sentezinde ise; monomerler, bu monomerlere ait olan polimerizasyon başlatıcıları ve çapraz bağlayıcıları eşliğinde çeşitli yapay yöntemlerle aynı zamanlı olarak polimerleşirler. İki polimerin de aynı olduğu koşullarda her iki yöntem de kullanılarak, homo-IPN'ler hazırlanabilir [50].

Destek materyali ile enzim molekülünün bağlanmasında enzimin protein yapısından faydalanılır. Enzim taneciğinin içerdiği fonksiyonel gruplar bağlanmada etkilidir [51].

1.7. Azo boyaları

Azo boyalarını iki bölümde inceleyebiliriz.

•Monoazo boyaları

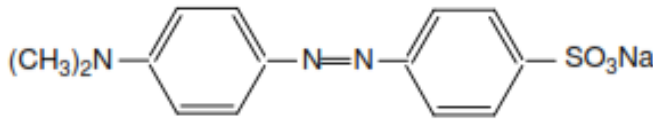
Boyaların bu çeşiti hem asit karakterde olup hem de kromofor grubu azo ($-N=N-$) bağ ile benzen halkasına bağlanmıştır. Halkada OH ve NH_2 gruplarının katılması sırasıyla asidik ve bazik karakter meydana getirir. Bordo kırmızısı, fast sarısı, janus yeşili-B, metil oranj, metil kırmızısı, oranj-G boyaların örnek verilebilir.

- Diazo ve poliazo boyaları

Eğer molekül içinde fazla sayıda azo grubu varsa bu çeşit boyalar elde edilir. Azo mavisi, bismark braun-Y, brillant purpurin-R, klorazol siyahı-E, kongo kırmızısı, sudan siyahı -B, sudan kırmızısı -7B, tripan mavisi boyaları örnek verilebilir [52].

Metil Oranj

Su içerisinde çözünebilen monoazo boyalardan biri olan metil oranjin, tekstil, kağıt, ilaç, baskı, gıda endüstrisinde geniş kullanım alanı bulunmaktadır. Metil oranjin sulu çözeltisi zayıf asit karakterinde olduğu için asit-baz indikatörü olarak analitik kimya çalışmalarında kullanılmaktadır [53]. Metil oranjda baz özelliğın karşılığı kırmızı renk asit özelliğın karşılığı ise sarı renktir. 3,1 - 4,4 arasında pH geçişı sağlar.



Şekil 1.11. Metil Oranj

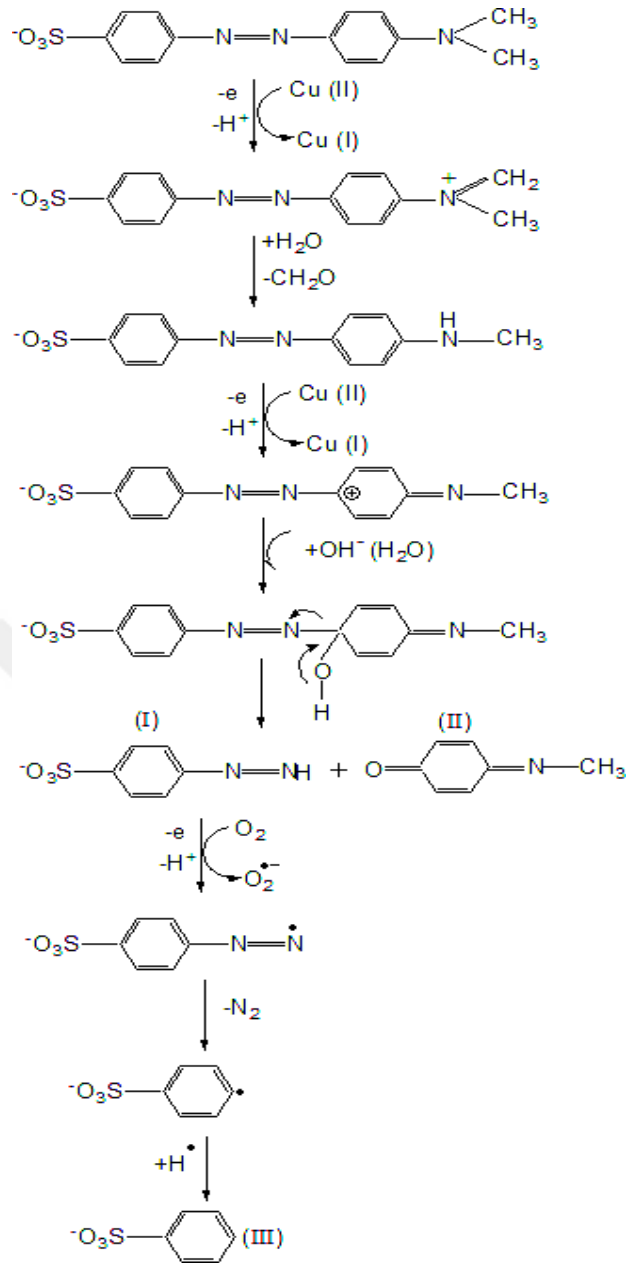
1.8. Enzimatik Renk Giderme

Enzimatik renksizleştirme tepkimeleri endüstrinin çeşitli kollarında kullanılmaktadır [54]. Tekstil, kağıt, kozmetik, sentetik boyalar ve ilaç sektörleri örnek olarak verilebilir. Boyaların reaksiyon sonunda meydana gelen atıklarının çoğunluğının tabiatta parçalanma sorunları olduğu için çevre kirliliğine sebep olurken insan sağlığını tehdit eder konuma gelir [55]. Boya atıklarının giderilmesi için renksizleştirme çalışmaları çeşitli fiziksel ve kimyasal yöntemlerle yapılabilir. Adsorpsiyon, koagülasyon-flokülasyon, iyon değiştirme, yükseltgenme bu yöntemler arasında sayılabilir. Uygulanan

yöntemlerin yüksek maliyetleri onların kullanımlarına bir sınır koyduğu için boya atıklarının biyolojik bozunmasının enzimatik olarak meydana gelmesi için ekstra bir yöntem olarak ortaya çıkmaktadır [54].

Enzimatik renk giderme sayesinde bozunmaya karşı direnç gösteren atıkların giderilmesi, atık derişimlerinin yüksek ve düşük aralıkta olabilmesi ve pH ve sıcaklık skalasının geniş bir yelpazede olması artı yönleridir. Avantajları arasında ayrıca serbest enzimle beraber immobilize enzimin kullanılması katalitik işlemlerde aktifliklerini koruyarak tekrar tekrar kullanılabilmesi ve yöntemin maliyetinin oldukça düşük olması sayılabilir. Oksidoredüktaz özellikte olan lakkaz enzimi boyaların giderilmesinde kullanılması son zamanlarda araştırmacıların dikkatini çeker hale gelmiştir [56].

Serbest lakkaz ve immobilize lakkaz, azo, triaril metan, antrakinon ve indigo boya çeşitlerinin renk giderilmesinde yararlanılır [57]. Örnek olarak, metil oranj (Acid Orange 52) azo boyasının renginin lakkazla giderilmesi Şekil 1.12' de verilmiştir. Şekil 1.12' deki sistemde metil oranjın bozunma mekanizmasının ilk aşaması, lakkaz içindeki Cu^{+2} iyonunun 1 elektron alarak Cu^{+1} e indirgenmesi gerçekleşirken, metil oranjın üçüncül amin grubunun iminyum katyonuna yükseltgenmesidir. Sonuç olarak katyon hidrolizi ile sistemden formaldehit uzaklaştırılarak bu iyon ikincil amin grubuna dönüşür. Devamında lakkaz ikincil amin grubunu yükseltgeyerek karbonyum iyonunun oluşumunu sağlar. Sonraki aşamalarda meydana gelen hidroliz ile 3-diazenil-benzensülfonik asit (I) ve 4-metilimino-siklohekza-2,5- dienon (II) oluşur. I numaralı ürünün oksijenle yükseltgenmesi ve bir N_2 molekülü kaybetmesiyle benzensülfonik asit radikali meydana gelir. Oluşan radikalin hidrojen radikali ile biraraya gelmesiyle de benzen sülfonik asit (III) oluştuğu görülmektedir. Mekanizmanın aktif bir şekilde işliyor olması halinde zehirli aromatik aminlerin oluşumu engellenir ve bu sayede çevre kirliliğinin önlenmesinde fazlasıyla yarar sağlanmış olur [58].



Şekil 1.12. Lakkaz enzimi ile metil oranjin bozunma mekanizması

1.9. Lakkaz Enzimi İmmobilizasyon Çalışmaları

1995 yılında Rogalski ve arkadaşları lakkaz enzimini *Phlebia radiata*'dan elde ederek α -aminopropil-trietoksisilan ile aktifleşmesini sağladıktan sonra gözenekli cam üzerinde kovalent bağ ile immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Enzim bağlama kapasitesini %98 ve immobilize edilmiş enzim aktifliğini %96 hesapladılar. 4°C'da iki hafta boyunca depolandığında immobilize enzimin aktifliğini %100 koruduğunu buldular [59].

1998 yılında Luterek ve arkadaşları *Cerrena unicolor*'dan ürettikleri lakkaz enzimini siringaldazin substratı kullanarak gözenekli cam küreler üzerinde immobilizasyonunu gerçekleştirmişler ve enzimin bağ kapasitesini %94, immobilize edilmiş enzimin aktifliğini %100 bulmuşlardır. İmmobilizasyon sonunda optimum pH'nın 5,5'den 5,7 değerine değiştiğini gözlemlediler. 4°C'da 7 ay süresince saklanan immobilize enzimin aktifliğini %95, serbest enzim aktifliği %40 korunduğunu bulmuşlardır [60].

1999 yılında D'Annibale ve arkadaşları *Lentinula edodes*'ten ürettikleri lakkaz enzimini zeytinyağı üretiminde fabrika atık sularında mevcut olan fenol bileşiklerinin giderilmesi konusunda glutaraldehit ile çapraz bağ yaparak ve adsorpsiyon yöntemi kullanılarak kitosan üzerine immobilizasyonu gerçekleştirmişlerdir. DMP (2,6-dimetoksifenol) substrat olarak kullanılmıştır. Serbest ve immobilize enzim için optimum pH değeri 4,0, optimum sıcaklıkları ise sırasıyla 50°C ve 60°C, K_m değerlerini 77 μ M ve 256 μ M bulunmuştur [61].

2000 yılında Lante ve arkadaşları *Plerotus ostreatus*'dan ürettikleri lakkaz enzimini atık su içindeki çeşitli fenol bileşiklerinin giderilmesi üzerinde yaptıkları araştırmada adsorpsiyon yöntemi ile polietersülfon membrana immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Siringaldazin substratınının kullanıldığı bu çalışma sonunda serbest enzim için optimum pH 6,3 immobilize enzim için ise pH 6,6, optimum sıcaklık serbest enzim için 40°C, immobilize enzim için ise 35°C olarak bulmuşlardır. Enzim bağlanma

kapasitesi %40 ve 32°C'da immobilize enzimin serbest enzime göre %18 daha etkin olduğunu tespit etmişlerdir [62].

2001 yılında Freire ve arkadaşları *Trametes versicolor*'dan üretilen lakkaz enzimini adsorpsiyon ve kovalent bağlanma metodu ile aktive edilmiş karbon fiber mikro elektrotlar üzerinde immobilizasyon sağlamışlardır. Katekol substrat olarak kullanılmış ve optimum pH'sı 5,0 olarak tespit edilmiştir. 2 ay sonunda immobilize lakkazın hala aktifliğini koruduğunu bulmuşlardır [63].

2002 yılında Al-Adhami ve arkadaşları üç farklı beyaz çürükçül mantardan (*Trametes versicolor*, *Cerrena unicolor* ve *Heterobasidin annosun*) ürettikleri lakkaz enziminin DEAE-Granocel 500, CM-Granocel ve akrilik taşıyıcılara kovalent bağlanma yöntemi ile immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Sustrat olarak siringaldazin kullanıldığında *Cerrena unicolor*'dan üretilen lakkaz için optimum pH 5,2, DEAE-Granocel üzerine immobilize edilmiş lakkaz için optimum pH 5,0, optimum sıcaklığı ise serbest enzim için 40°C ve immobilize enzim için 55°C olarak tespit etmişlerdir. İmmobilize lakkazın 4°C'da 4 ay süresince saklanması sonucunda aktifliğinin %90'ını koruduğu bulunmuştur [64].

2003 yılında Zille ve arkadaşları *Trametes villosa*'dan ürettikleri lakkaz enzimini alümina yüzeyine immobilizasyonunu sağlayarak tekstilde kullanılan Reactive Black 5 boyasının renginin giderilmesini sağlamışlardır [65].

2004 yılında Dodor ve arkadaşları *Trametes versicolor*'dan üretilen lakkaz enzimi kaolinit üzerinde immobilize ederek polisiklik aromatik hidrokarbonlar; piren, benzopiren, benzoantrasen maddelerinin ortamdaki giderilmesi için çalışmışlardır. İmmobilize edilmiş enzim için optimum pH değerini 4,5 bulmuşlardır. Asidik ortamda serbest enzimin aktifliğinin %97'den fazlasını kaybettiğini, immobilize enzimin aktifliğinin ise %40'ından fazlasının korunduğunu ve serbest enzimin optimum sıcaklığının 40°C, immobilize enzimin ise 60°C olarak tespit etmişlerdir. 4°C'da 4 ay süresince saklandığında serbest enzimin aktifliğinin %90'ını koruduğunu, immobilize

enzimde ise 4°C'da 90 gün süresince saklandığında aktifliğinde kayıp olmadığını tespit etmişlerdir. ABTS substratı (2,2'-azinobis-3-metilbenzotiazolin-6-sülfonik asit) kullanılarak K_m değerini serbest enzim için 0,262 mM, immobilize enzim için 0,165 mM olarak tespit etmişlerdir [66].

2004 yılında Quan ve arkadaşları lakkaz enziminin aktive edilmiş platin elektrot üzerine kovalent bağlanması yöntemi ile immobilize etmişler, biyosensör olarak kullanarak karakterize etmişlerdir. Platin yüzeyinde immobilizasyonu sağlanmış lakkazın K_m sabiti 85µM bulunmuştur [67].

2005 yılında Dominguez ve arkadaşları *Trametes hirsuta*'dan elde edilen lakkaz enziminin aljinat kürelerine immobilize ederek boyaların renksizleştirilmesini araştırmışlardır [68].

2006 yılında Zawisza hidrofilik silika filmler üzerinde immobilizasyonu gerçekleştirilen lakkaz enziminin biyolojisinin ve fizikokimyasının serbest lakkazla bir olduğunu buldukları araştırmada altın elektrotlar üzerinde biriktirilen terametoksilan'dan meydana gelen ince hidrofilik silika jelde mikrokapsülleme yöntemi ile *Cerrena unicolor*'dan üretilen lakkaz enzimi immobilize etmişlerdir. Immobilize enzimin optimum pH aralığı 4,2 – 5,2, optimum sıcaklığı ise 40 – 50°C olarak tespit etmişlerdir [69].

2007 yılında Dominguez ve arkadaşları aljinat kürelerinde immobilizasyonu gerçekleştirilen *Trametes versicolor*' dan elde edilen lakkazın değişik indükleyiciler kullanarak aktivitesi araştırmışlardır [70].

2007 yılında Champagne ve arkadaşları *Trametes versicolor*'dan üretilen lakkaz enziminin silika kürelerine immobilize edilerek bir antrakinon boyası Reactive blue 19'un renk giderme konusunda çalışmışlardır [71].

2008 yılında Niladevi ve arkadaşları *Streptomyces psammoticus*'dan ürettikleri lakkazın immobilizasyonu ve dolgu biyoreaktör kullanımı ile fenol bileşiklerinin giderilmesi konusunda çalışmışlardır [72].

2009 yılında Fang ve arkadaşları lakkaz enzimini manyetik kitosan nanopartikülleri hazırladıktan sonra gluteraldehit ile çarpaz bağ ile immobilizasyon koşulları, immobilize enzim karakter tayini ve biyosensör şeklinde kullanımı üzerinde araştırma yapmışlardır [73].

2012 yılında Gökgöz, M. ve Altınok, H. Agoricus bisperusdan elde edilen lakkazı kullanarak poliakrilamit ve poliakrilamit/K-Karejenan ile hazırlanmış kısmi kısmi iç içe geçmiş polimer ağları üzerine immobilize etmişlerdir. Optimum pH serbest lakkaz için 6,0, pAAM-L, PAAM/K-car (0,05)-L ve pAAM/K-car (0,1)-L için sırayla 8,0, 8,5 ve 9,0 bulmuşlardır. Optimum sıcaklık serbest lakkaz için 45°C, tüm immobilize lakkazlar için 60°C olarak bulmuşlardır. 4°C'da 27 gün depolama sonunda serbest lakkaz başlangıç aktivitesinin tamamını kaybederken immobilize enzimlerin %56-%80 oranında başlangıç aktifliklerini koruduğunu bulmuşlardır. Immobilize örnekler 35 kez kullanım sonrasında %28 ve %58 oranında başlangıç aktifliklerini korumuşlardır. Sringaldazin substratı kullanarak Linear_BurK grafiğine göre $K_{m(app)}$ serbest lakkaz, PAAM-L, PAAM/K-car (0,05)-L ve PAAM/K-car (0,1)-L için sırayla 0,088, 0,139, 0,133 ve 0,131 mM olarak hesaplanırken V_{max} değerleri sırayla $2,83 \times 10^{-3}$, $4,51 \times 10^{-3}$, $4,76 \times 10^{-3}$ ve $4,97 \times 10^{-3}$ mM.min⁻¹ olarak bulmuşlardır [74].

2013 yılında Sanlier, S.H. ve arkadaşları biyoteknolojik uygulamalar için belirli koşullarda aljinat kürelerine lakkaz immobilizasyonu yapmışlardır. Asidik koşullarda serbest lakkaz ve immobilize lakkaz karşılaştırıldığında %30 daha büyük sonuç elde edildi. pH 9-10 aralığında immobilize lakkaz yaklaşık %20 oranında daha fazla aktivite göstermiştir. Serbest lakkaza oranla immobilizasyon sonra pH kararlılığının arttığını bulmuşlardır. 60°C üzerinde küre yapıları bozulmaya başladığı sonucunu buldular. 60°C'da serbest lakkaz başlangıç aktifliğinin %45'ini korumuştur. Immobilize lakkazın ise %85 oranında koruduğunu buldular. 4°C'da 10 günlük depolama sonrasında serbest lakkaz ve immobilize lakkaz sırasıyla başlangıç aktifliğinin %8,08 ve %80,83'ünü koruduğunu tespit etmişlerdir. 4 kez kullanım sonunda immobilize lakkazın başlangıç aktifliğinin %80'ini

koruduğunu buldular. İmmobilize lakkaz için optimum sıcaklık 45°C' da Direct Red 23 boyasının renk giderme yüzdesini en yüksek oranda buldular. Renk giderme yüzdeleri serbest lakkaz için 25°C' da %50, aljnat küreler için %16 ve 25°C' da immobilize lakkaz için %59, 45°C' da immobilize edilen lakkaz için %86 olarak buldular [75].

2014 yılında Patel, S. K. S. ve arkadaşları serbest lakkazdaki kararlılık ve tekrar kullanılabilme özellikleriyle ilişkili problemlerin üstesinden gelmek amacıyla *T.versicolor*'dan elde edilen lakkazı SiO₂ nanopartikülleri üzerine immobilize etmişlerdir. Optimum pH ve sıcaklığı immobilize lakkaz için 35-45°C olarak buldular. ABTS substratı kullanarak Michaelis-Menten Eşitliği ile analiz edilen kinetik parametreler V_{max} ve K_m serbest lakkaz için 1,890 mMmm⁻¹ ve 29,3 mM. İmmobilizasyon sonrası K_m değeri 46,5 mM' e yükselirken V_{max} değeri yavaşça 1,630 mMmm⁻¹ a inmiştir. Termal deaktivasyon sabiti (k_d) immobilize lakkaz için 0,02 olarak buldular. Bu değeri serbest lakkazdan 18 kat daha aşağıdadır. 4 saat sonunda immobilize lakkaz için yarılanma ömrü $t_{1/2}$, 30°C, 40°C, 45°C, 50°C ve 60°C için sırayla 76,9, 64,8, 40,3, 24,6 olarak buldular. Bu değerler serbest lakkaz için var olan değerlerden 8,3, 8,8, 10,9, 11,2, ve 8,1 daha yüksektir. 5 ve 10 kez kullanım sonrasında immobilize lakkazın başlangıç aktivasyonu sırasıyla %93,7 ve %82,5 oranında korunduğunu buldular [76].

2015 yılında Ramirez-Montaya, L.A. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazın immobilizasyonu ve farklı moleküllerle beraber renklerinin giderilmesi üzerine çalıştılar. Asit oranj 7 (AO7), Asit Mavi 74 (AB74), Reaktif kırmızı (RB2) ve Reaktif Siyah 5 (RB5) boya larını çalışmalarında kullanmışlardır. Çalışma sonunda asit boyaları (AO7 ve AB74) kullanıldığında biyokataliz renk giderme yüzdelerinin diğer reaktif boya ların renk giderilmesinden %90 daha fazla etkili olduğunu buldular [77].

2015 yılında Sun, H. ve arkadaşları boya kirleticilerinin enzimatik giderilmesinde gelişmiş dayanıklılık için *Trametes versicolor*'dan temin edilen lakkazı süngerimsi yapıda olan çitosana enjekte edilmiş poliakrilamit hidrojellerine immobilizasyonunu gerçekleştirdiler. 48 saatlik inkübasyon sonunda immobilize lakkazın aktiviteleri serbest lakkaza oranla azalmıştır. Asidik ortam pH 3,0 iken immobilize lakkaz Lac-PAM-CTS başlangıç aktivitesinin %75'ini korumuştur. Serbest lakkaz ise %4,3 koruyabilmiştir. 65°C' da termal deaktivasyon hızı serbest lakkaza oranla daha azdır. Yarılanma ömrü ($t_{1/2}$) serbest lakkaz ve immobilize lakkaz için sırasıyla 0,3 ve 4,1' dir. Termal deaktivasyon sabitleri (k_d) ABTS substratı kullanarak Michaelis-Menten Eşitliğine göre hesaplanan kinetik parametreler K_m serbest lakkaz ve immobilize lakkaz Lac-PAM-CTS için sırasıyla $0,156 \times 10^{-3}$ mM ve $1,680 \times 10^{-3}$ mM, V_{max} ise $2,15 \text{ mMmm}^{-1}$ ve $3,91 \text{ mMmm}^{-1}$ olarak buldular. Lac-PAM-CTS ile farklı iki boya A07-MG üzerinde renk giderilmesi için çalıştılar. A07' nin renk giderilmesinde Lac-PAM-CTS delac-PAM-CTS' ye oranla daha başarılı bulundu. delac-PAM-CTS ile renk giderilme sadece iyonik A07' nin katyon destekli matrise adsorpsiyonu ile olur. MG renk giderilmesi sadece enzimatik olarak sağlanabilir. Lac-PAM-CTS 6 kez kullanım sonrası renk giderebilmektedir. Aynı özelliği serbest lakkaz da göstermektedir. Serbest lakkaz ile MG renk giderilmesi Lac-PAM-CTS'nin giderilmesinin yarısı kadardır. Kullanım devam ettikçe daha etkili sonuçlar elde edilir [78].

2016 yılında Zhilin, L. ve arkadaşları *Agaricus Bisporus* lakkaz enzimini çapraz bağlama ayırıcı gluteraldehit kullanarak seramik-çitosan kompozit destek meteryali üzerine immobilize ettiler. Yağlı atık su iyileştirme potansiyelini inceledikleri çalışmalarında immobilizasyon koşulları ve enzim immobilizasyonu üzerine çalıştılar. Immobilize lakkaz için optimum pH 3,0 ve optimum sıcaklıklar 25°C, 50°C olarak buldular. ABTS substratı kullanarak hesapladıkları kinetik parametreler K_m sebest lakkaz ve immobilize lakkaz için sırasıyla 34,41 mmol/L ve 66,64 mmol/L olarak buldular. V_{max} değerlerini ise 0,223 mmol/L.min ve 0,036 mmol/Lmin olarak buldular. 10 kez kullanım sonunda immobilize lakkaz başlangıç aktifliğinin

%90,6' sını korumuştur. 4°C' da 30 gün depolama sonunda immobilize lakkaz başlangıç aktifliğinin %5,4'e düştüğünü buldular. Aynı koşullarda serbest lakkaz aktifliğinin 30 gün sonunda %94,2' nin altında olduğunu buldular [79].

2016 yılında Dai, J. ve arkadaşları azo boyalarının renk giderilmesine yönelik yaptıkları çalışmada *Pleurotus ostreatus*'dan elde edilen lakkazın bağlama ayırıcı gluteraldehit kullanarak Fe₃O₄/SiO₂ nanopartiküllerine immobilize ettiler. (Nanoölçekte gözeneksiz Fe₃O₄/SiO₂ nanopartiküllerine yapılan bu immobilizasyon çalışması ilktir.) Procian Kırmızısı MX-3 substratı kullanıldığına 4°C' da 5 ay depolama sonrasında tüm enzimlerin aktifliğini koruduğunu buldular. 1 saat sonunda immobilize lakkazın renk giderilme yüzdesini %96 olarak buldular. ABTS substratı kullanarak immobilize lakkaz ve serbest lakkaz için kinetik parametreler K_m sırasıyla 7,4,x,10⁻⁵ mmol ve 1,3,x,10⁻⁵ mmol, V_{max} ise 0,051 mmol/min ve 0,022 mmol/min olarak buldular [80].

2017 yılında Taheran, M. ve arkadaşları ev yapımı poliakrilonitril-biyolojik kömür kompozit nanolifli membranlar üzerine lakkaz immobilizasyonu yaparak sulu ortamda bulunan formasötik bileşikler klortetrasiklini giderme üzerine çalışmışlardır. Optimum pH immobilize lakkaz için 4,5 ve serbest lakkaz için 4,0 olarak buldular. Optimum sıcaklık ise sırasıyla serbest lakkaz için 30°C-40°C aralığı immobilize lakkaz için 40°C -50°C tespit ettiler. 4°C ve 25°C' da 1 ay depolama sonunda immobilize lakkaz başlangıç aktivitesinin sırasıyla %71-%31' ini koruduğunu buldular. Serbest lakkaz ise %37-%2 oranında başlangıç aktivesini koruyabilmiştir. 7 kez art arda kullanım sonunda immobilize lakkaz başlangıç aktifliğinin %32,7' sini koruduğunu buldular [81].

2017 yılında Apriceno, A, ve arkadaşları Antraseni metana dönüştürerek yok etmek amacıyla çitosan mikrokürelerine *Trometes versicolor* lakkazını gluteraldehit aktivasyonu ile kovalent olarak imboilize ettiler. Biyoreaktör sistemde ABTS substratı kullanarak kinetik prometre K_m ve V_{max} serbest

lakkaz ve immobilize lakkaz için sırasıyla 0,041-0,013 mM ve 0,002-0,0011 mmol/min.mg olarak buldular. Sıcaklık çalışmalarında 55°C'da immobilize lakkaz başlangıç aktifliğinin %83' ünü korumuştur. 40°C' da serbest lakkaz ise ısı denetasyonuna uğramış başlangıç aktifliğinin %80' ini kaybetmiştir. Serbest lakkaz için 25°C üzeri tepkime için uygun olmadığını buldular. Eğer gluteralehit konsantrasyonu %1.25'e düşürülürse immobilize lakkazın 3. kullanımında bozunma meydana gelmiyorsa enzim kararlıdır [82].

2017 yılında Naghdi, M. ve arkadaşları karbamazepin giderilmesinde mineral asit iyileştirme amaçlı nanobiyolojik kömürlerin oksitlenmelerinin etkisini ve pyrolysis biyokütlesi tarafından karbonlu maddeler üretimi üzerine yaptıkları çalışmada HCl, H₂SO₄, HNO₃ ve bunların karışımlarını kullanarak lakkaz immobilizasyonu yaptılar. Optimum pH hem serbest hem de immobilize lakkaz için aynı değer olup 4,0' dür. Optimum sıcaklık ise ikisi içinde 30°C' dir. Oda sıcaklığında 30 gün depolama süresinde nanobiyolojik kömür immobilize lakkaz sistemi serbest lakkaza oranla daha verimli sonuçlar vermiştir. 5 gün boyunca depolandığında immobilize lakkazın başlangıç aktifliğinin %31'ini kaybettiğini ancak serbest lakkazın %58' ini kaybettiğini buldular. 30 günün sonunda ise serbest lakkaz tüm aktifliğini kaybederken immobilize lakkaz başlangıç aktifliğinin %15'ini korumuştur [83].

2017 yılında Li, G. ve arkadaşları bakteriyel selüloz/TiO₂ işlevli kompozit membranlara lakkaz immobilize ederek biyokatalizör boya ve ışın giderilmesini değerlendirdiler. Lakkazın kovalent immobilizasyonunda BC' nin hidroksil grupları, aldenit grupları içine başarıları bir şekilde oksitlenmiştir. Optimum pH serbest lakkaz, OBC-lac ve OBC/TiO₂ -lac için sırasıyla 3,5, 3,0, 2,5 olarak buldular. Optimum sıcaklık da sırasıyla 55°C, 50°C olarak tespit ettiler. 6 kez kullanım sonunda OBC-lac ve OBC/TiO₂-lac %50 ve %70 başlangıç aktifliklerini koruyabildiklerini buldular. 10 kez kullanım sonunda ise %40-%57 oranlarında aktifliklerini korumuşlardır. ABTS substratı kullanarak hesaplanan kiretik parametre K_m ve V_{max}

serbest lakkaz, OBC-lac ve OBC/TiO₂-lac için sırayla 0,12 mM/L, 1,65 mM/L, 0.91 mM/L ve 59,52 mol/L.min 10,28 mol/L.min, 4,29 mol/L.min olarak buldular. 1 saat sonunda boya giderilmesi %70 olarak bulunurken 3 saat sonunda değerde artış oluyor ve %82 olarak buluyorlar [84].

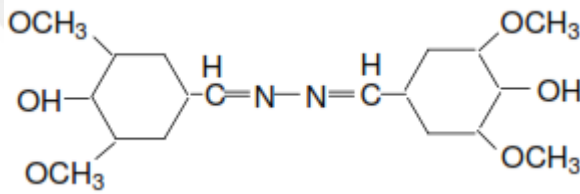
2017 yılında Asgher, M. ve arkadaşları *Trametes versicolor* IBL-04 lakkazının çeşitli özellikleri uzun dönem kararlılık, tekrar kullanılabilirlik kataliz yeterliliğinin arttırılması amacıyla agar-agar poliakrilamit ve jelatin destek materyallerine immobilizasyonunu yaptılar. Optimum pH serbest lakkaz, agar-agar/lakkaz, poliakrilamit/lakkaz ve jelatin/lakkaz için sırasıyla 5,0, 7,0, 3,0 ve 6,0 bulundu. Optimum sıcaklık 45°C, 55°C, 60°C, 60°C olarak bulundu. ABTS kullanarak K_m ve V_{max} değerleri incelenirken K_m değerlerinin immobilize sistemlerde artarken V_{max} değerlerinin düştüğünü buldular. 4°C' da 6 hafta boyunca depolama sonunda 42. günde serbest lakkaz, agar-agar/lakkaz, poliakrilamit/lakkaz ve jelatin lakkaz için sırasıyla %18,04, %59,96, %44,6, %38,1 başlangıç aktivitelerini koruduklarını buldular. 3 kez art arda kullanım sonunda agar-agar/lak %76,5, poliakrilamit/lak %81,72 ve jelatin/lak %71,3 oranında başlangıç aktifliklerini korurken 8.kez ABTS oksidasyonu sonunda %24,8, %28,3, %22,8 oranında aktifliklerini koruduklarını buldular [85].

2. MATERYAL VE YÖNTEM

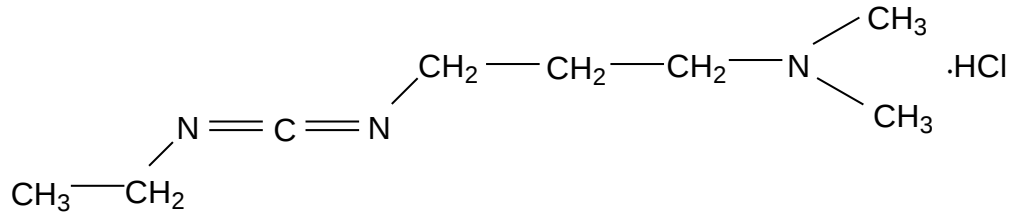
2.1. Kimyasallar

Lakkaz : (Trametes versicolor (EC 1.10.3.2. 12,9 U/mg) : Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.

Siringaldazin : (4-Hidroksi-3,5-dimetoksibenzaldehit azin) :
(C₁₈H₂₀N₂O₆, MA: 360,3 g/mol) Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.

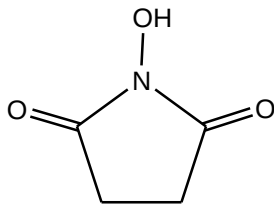


1-Etil-3-(3-Dimetilaminopropil) Karbodiimit Hidroklorür :
(C₈H₁₇N₃ . HCl, MA: 191,7 g/mol) Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.

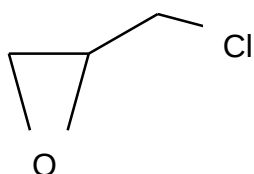


Etil alkol (Mutlak) : (C₂H₅OH, MA : 46,06 g/mol) Sigma-Aldrich firmasından temin edildi.

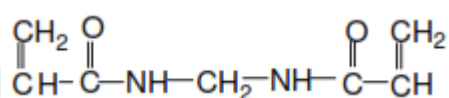
N-Hidroksisüksinimit : (C₄H₅NO₃, MA: 115,09 g/mol) Fluka (Almanya) firmasından temin edildi.



Epiklorhidrin : (C_3H_5ClO , MA: 92,53 g/mol ve $d= 1,183 \text{ g/cm}^3$) Fluka, Aldrich (Almanya) firmalarından temin edildi.



N,N'-Metilen-bis-akrilamit : ($C_7H_{10}N_2O_2$, MA:154,16 g/mol) Aldrich (Almanya) firmasından temin edildi.

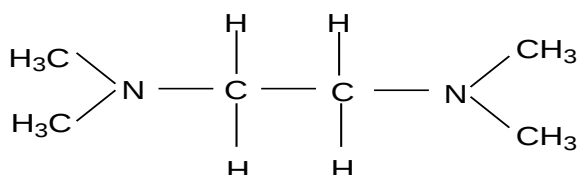


Fosforik asit : (H_3PO_4 , MA:98,0 g/mol) Riedel-de Haen (Almanya) firmasından temin edildi.

Sitrik asit : ($C_6H_8O_7$, MA:192,13 g/mol) Sigma- Aldrich (Almanya) firmasından temin edildi.

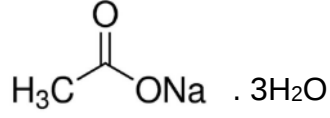
Sodyum hidroksit : ($NaOH$, MA:40,0 g/mol) Sigma- Aldrich (Almanya) firmasından temin edildi.

N,N,N',N'-Tetrametiletilendiamin (*TEMED*) : ($C_6H_{16}N_2$, MA: 116,21 g/mol) Sigma (Almanya) firmasından temin edildi.



$$\text{CH}_2=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{NH}_2$$
$$\text{CH}_2=\text{CH}-\overset{\text{O}}{\parallel}\text{C}-\text{OH}$$
CN(C)c1ccc(cc1)/N=N/c2ccc(cc2)S(=O)(=O)[O-].[Na+]
$$^+\text{NH}_4^-\text{O} - \text{S}(\text{O})_2 - \text{O} - \text{O} - \text{S}(\text{O})_2 - \text{O}^-\text{NH}_4^+$$
$$\begin{array}{c} \text{H} \\ | \\ \text{H}-\text{C}-\text{C} \begin{array}{l} \nearrow \text{O} \\ \searrow \text{O}-\text{H} \end{array} \\ | \\ \text{H} \end{array}$$

Na- Asetat trihidrat : (C₂H₃NaO₂.3H₂O, MA : 136,03 g/mol) Sigma-Aldrich (Alman) firmasından temin edildi.



2.2. Cihazlar

Spektrofotometre: SHIMADZU UV / Vis-1800 Spektrofotometre

pH metre: Orion pH metre 420 A + Thermo electron corp.

Çalkalamalı su banyosu: JEIOTECH/BS-21

Terazi: Sartorius CP224S

Isıtıcı: IKA-RH basic

2.3. Çözeltilerin Hazırlanışı

2.3.1. Sodyum Hidroksit Çözeltisi

8,0 g sodyum hidroksit maddesi saf su içerisinde çözüldükten sonra hacim 100 mL' ye tamamlandı (2,0 M).

2.3.2. Siringaldazin Çözeltisi

0,00360 g siringaldazin maddesi mutlak etil alkol içerisinde çözöldükten sonra hacim 100 mL' ye tamamlandı (0,1 mM).

2.3.3. Sitrat Tamponu

2,104 g sitrik asit saf su içerisinde çözöldükten sonra hacim 250 mL' ye tamamlandı. 2,0 M sodyum hidroksit çözeltisi ile pH 5,3'e ayarlandı (0,04 M, pH: 5,3).

2.3.4. Fosfat Tamponu

1,35 mL fosforik asit saf su içerisinde çözöldükten sonra hacim 500 mL' ye tamamlandı. 2,0 M NaOH çözeltisi ile pH 6,5'e ayarlandı.

2.3.5. Lakkaz Çözeltileri

2.3.5.1. Lakkaz Çözeltisi (a)

0,0100 g lakkaz enzimi tartılıp üzerine fosfat tamponu (0,04 M pH: 6,5) eklenerek hacim 100 mL' ye tamamlandı. Hazırladığımız enzim çözeltisinden 25 mL alıp üzerine fosfat tamponu (0,04 M pH: 6,5) ekleyerek hacmi 50 mL' ye tamamlandı (0,01 mg/mL) .

2.3.5.2 Lakkaz Çözeltisi (b)

4 mg lakkaz enzimi tartılıp üzerine Na-asetat tamponu (0,1 M, pH : 4,5) eklenerek hacim 10 mL' ye tamamlandı (0,4 mg/mL).

2.3.5.3. Lakkaz Çözeltisi (c)

0,01 g lakkaz enzimi tartılıp üzerine fosfat tamponu (0,04 M, pH : 6,5) eklenerek hacim 5 mL' ye tamamlandı.

2.3.5.4. Lakkaz Çözeltisi (d)

0,2 g lakkaz enzimi tartılıp üzerine fosfat tamponu (0,04 M, pH : 6,5) eklenerek hacim 100 mL'ye tamamlandı.

2.3.6. Sodyum Asetat Tamponu

4,8 g sodyum asetat-trihidrat ve 3,6 mL asetik asit alınıp saf su içerisinde çözüldükten sonra hacim 1 L' ye tamamlandı. 2,0 M NaOH çözeltisi ile pH' sı 4,5 olarak ayarlandı (0,1M, pH: 4,5).

2.3.7. Metil Oranj Çözeltisi

$3,0 \times 10^{-5}$ M' lik metil oranj çözeltisi sodyum asetat tamponunda (0,1M, pH : 4,5) hazırlandı.

2.3.8. Karbodiimit Çözeltisi

100 mg karbodiimit 100 mL saf su içerisinde çözüldü.

2.3.9. N-Hidroksisüksinimit Çözeltisi

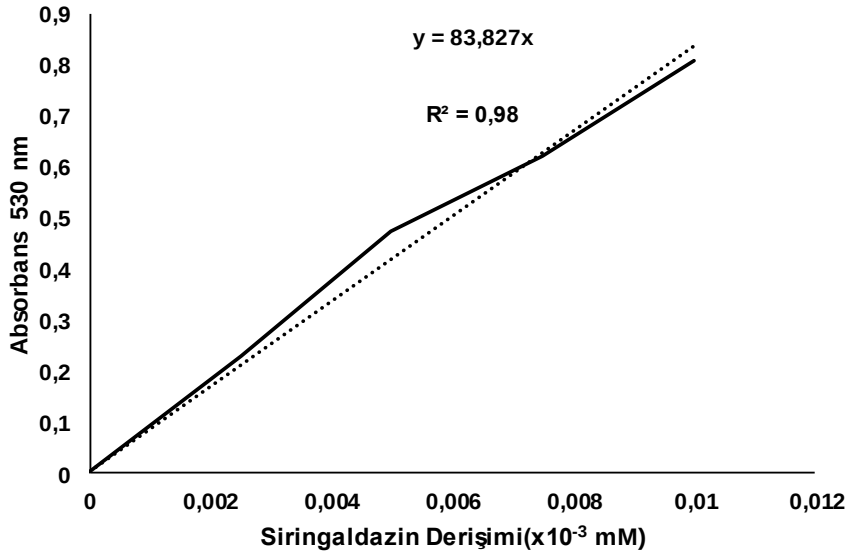
100 mg N-Hidroksisüksinimit 100 mL saf su içerisinde çözüldü.

2.4. Siringaldazin Kalibrasyon Eğrisi ve Hazırlanışı

Siringaldazin kalibrasyon eğrisini elde etmek amacıyla çeşitli konsantrasyonlarda (0,100 mM, 0,075 mM, 0,050 mM, 0,025 mM) siringaldazin çözeltileri hazırladıktan sonra tepkime balonuna 9 mL sitrat tamponu (0,04 M, pH: 5,3) ve çeşitli konsantrasyonlardaki 1 mL siringaldazin çözeltisi eklendi. Çözeltilere 0,1 mL Lakkaz enzimi (0,01mg/mL) eklendikten ktrofotometresi (SHIMADZU UV/Vis1800) yardımıyla 530 nm dalga boyunda absorbansları okunarak kaydedildi. Siringaldazin konsantrasyonlarına karşılık gelen absorbans değerleri grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği hazırlandı (Çizelge 2.1, Şekil 2.1) .

Çizelge 2.1. Siringaldazin derişimi ile absorbansın değışimi

Siringaldazin Derişimi ($\times 10^{-3}$ mM)	Absorbans (A_{530})
0,0	0,000
2,5	0,230
5,0	0,474
7,5	0,623
10,0	0,810



Şekil 2.1. Siringaldazinin kalibrasyon grafiği

2.5. Kovalent Bağlanma Yöntemiyle Enzim İmmobilizasyonu

2.5.1. Epiklorhidrin Kullanarak Enzim İmmobilizasyonu

Monomer olarak 2,85 g Akrilamit (AAM), 2 mL Akrilik asit (AAc), çapraz bağlayıcı olarak 0,15 g N,N-metilenbisakrilamit (BAAM) ve başlatıcı olarak 10 mg Amonyum persülfat (APS) sırasıyla eklendikten sonra üzerine 20 mL saf su ilave edildi. Çözünme tam gerçekleşip homojen bir karışım elde edilene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Homojen bir çözelti oluştuğunda içine lakkaz çözeltisi (0,01 g / 5 mL) ilave edilerek karıştırma işlemine devam edildi. Homojen karışım bir petri kabına döküldü. Petri kabı buz dolu bir kap içerisine yerleştirildi. Petri kabı içerisindeki homojen karışım üzerine hızlandırıcı olarak yaklaşık 2,5 mL N,N,N',N'-tetrametilendiamin (TEMED) damla damla ve her bir noktaya temas edecek şekilde eklendi. Destek materyali olarak kullanılan AAM ve AAc monomerleri BAAM ve APS ile karşılaştıklarında TEMED, polimerleşme hızlandırıcı maddesinin de eklenmesi ile monomerlerin çapraz bağlanması ile kopolimerleşme gerçekleşti. AAc yapısındaki karboksil grupları ile monomerin hidrofilik ve

iyonik hidrojel üretimi ile suda çözünmeyen poli (akrilamit-co-akrilik asit) (P(AAm-co-AAc)) kopolimerik hidrojelleri elde edildi. Polimerleşme sonrası hidrojeller yaklaşık 5x5x5 mm boyutunda küp şeklinde kesildi. Jel küpleri bir saat saf su içerisinde 4 °C’ da buzdolabında bekletildi. Buzdolabından çıkartılan küpler 3 kez saf su ile yıkanıp süzüldü.

Yüzey aktifleştirme işlemi Epiklorhidrin (ECH) ile şu şekilde gerçekleştirildi. P(AAm-co-AAc) polimerik küpleri üzerine yaklaşık 80 mL ECH eklendi. ECH (99%) ilave edildikten sonra 40 °C’da 12 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilerek aktifleştirildi. ECH süzülerek ortamdan uzaklaştırıldı. Saf su ile 3 kez yıkandıktan sonra ECH ile bağlanmış küpler üzerine lakkaz çözeltisi (0,2 g lakkaz 100 mL (0,04 M, pH= 6,5) fosfat tamponunda çözülerek hazırlandı.) ilave edilerek 4 saat çalkalamalı su banyosunda oda sıcaklığında çalkalanarak enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Yüzeye adsorbe olan enzimleri uzaklaştırmak için 3 kez saf su ile yıkandı. Daha sonra kullanılmak üzere 4 °C’ da buzdolabında bekletildi. ECH karboksil grubu taşıyan matriksleri aktif hale getirip enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmasını sağlar.

2.5.2. Karbodiimit Kullanarak Enzim İmmobilizasyonu

Monomer olarak 2,85 g AAm, 2 mL AAc, çapraz bağlayıcı olarak 0,15 g BAAM ve başlatıcı olarak 10 mg APS sırasıyla eklendikten sonra üzerine 20 mL saf su ilave edildi. Çözünme tam gerçekleşip homojen bir karışım elde edilene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Homojen bir çözelti oluştuğunda içine lakkaz çözeltisi (0,01 g / 5 mL) ilave edilerek karıştırma işlemine devam edildi. Homojen karışım bir petri kabına döküldü. Petri kabı buz dolu bir kap içerisine yerleştirildi. Petri kabı içerisindeki homojen karışım üzerine hızlandırıcı olarak yaklaşık 2,5 mL TEMED damla damla ve her bir noktaya temas edecek şekilde eklendi. Destek materyali olarak kullanılan AAm ve AAc monomerleri BAAM ve APS ile karşılaştıklarında TEMED, polimerleşme hızlandırıcı maddesinin de eklenmesi ile monomerlerin çapraz

bağlanması ile kopolimerleşme gerçekleşti. AAc yapısındaki karboksil grupları ile monomerin hidrofilik ve iyonik hidrojel üretimi ile suda çözünmeyen P(AAm-co-AAc) kopolimerik hidrojelleri elde edildi. Polimerleşme sonrası hidrojeller yaklaşık 5x5x5 mm boyutunda küp şeklinde kesildi. Jel küpleri bir saat saf su içerisinde 4 °C'da buzdolabında bekletildi. Buzdolabından çıkartılan küpler 3 kez saf su ile yıkanıp süzüldü.

Yüzey aktifleştirme işlemi Karbodiimit (CDI) ile şu şekilde gerçekleştirildi. P(AAm-co-AAc) polimerik küpleri CDI çözeltisi (0,5 mM) içine ilave edildikten sonra 40 °C' da 12 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilerek aktifleştirildi. CDI çözeltisi süzülerek ortamdan uzaklaştırıldı. Saf su ile 3 kez yıkandıktan sonra CDI ile bağlanmış küpler üzerine lakkaz çözeltisi (0,2 g lakkaz 100 mL (0,04 M, pH= 6,5) fosfat tamponunda çözülerek hazırlandı) ilave edilerek 4 saat çalkalamalı su banyosunda oda sıcaklığında çalkalanarak enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Yüzeye adsorbe olan enzimleri uzaklaştırmak için 3 kez saf su ile yıkandı. Daha sonra kullanılmak üzere 4 °C'da buzdolabında bekletildi. CDI karboksil grubu taşıyan matriksleri aktif hale getirip enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmasını sağlar.

2.5.3. N-hidroksisüksinimit Kullanarak Enzim İmmobilizasyonu

Monomer olarak 2,85 g AAm, 2 mL AAc, çapraz bağlayıcı olarak 0,15 g BAAM ve başlatıcı olarak 10 mg APS sırasıyla eklendikten sonra üzerine 20 mL saf su ilave edildi. Çözünme tam gerçekleşip homojen bir karışım elde edilene kadar manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Homojen bir çözelti oluştuğunda içine lakkaz çözeltisi (0,01 g / 5 mL) ilave edilerek karıştırma işlemine devam edildi. Homojen karışım bir petri kabına döküldü. Petri kabı buz dolu bir kap içerisine yerleştirildi. Petri kabı içerisindeki homojen karışım üzerine hızlandırıcı olarak yaklaşık 2,5 mL TEMED damla damla ve her bir noktaya temas edecek şekilde eklendi. Destek materyali olarak kullanılan AAm ve AAc monomerleri BAAM ve APS ile karşılaştıklarında TEMED, polimerleşme hızlandırıcı maddesinin de eklenmesi ile monomerlerin çapraz

bağlanması ile kopolimerleşme gerçekleşti. AAc yapısındaki karboksil grupları ile monomerin hidrofilik ve iyonik hidrojel üretimi ile suda çözünmeyen P(AAm-co-AAc) kopolimerik hidrojelleri elde edildi. Polimerleşme sonrası hidrojeller yaklaşık 5x5x5 mm boyutunda küp şeklinde kesildi. Jel küpleri bir saat saf su içerisinde 4 °C' da buzdolabında bekletildi. Buzdolabından çıkartılan küpler 3 kez saf su ile yıkanıp süzüldü.

Yüzey aktifleştirme işlemi N-Hidroksisüksinimit (NHS) ile şu şekilde gerçekleştirildi. P(AAm-co-AAc) polimerik küpleri NHS çözeltisi içine ilave edildikten sonra 40 °C' da 12 saat çalkalamalı su banyosunda bekletilerek aktifleştirildi. NHS çözeltisi süzülerek ortamdan uzaklaştırıldı. Saf su ile 3 kez yıkandıktan sonra NHS ile bağlanmış küpler üzerine lakkaz çözeltisi (0,2 g lakkaz 100 mL (0,04 M, pH= 6,5) fosfat tamponunda çözülerek hazırlandı.) ilave edilerek 4 saat çalkalamalı su banyosunda oda sıcaklığında çalkalanarak enzim immobilizasyonu gerçekleştirildi. Yüzeye adsorbe olan enzimleri uzaklaştırmak için 3 kez saf su ile yıkandı. Daha sonra kullanılmak üzere 4 °C' da buzdolabında bekletildi. NHS karboksil grubu taşıyan matriksleri aktif hale getirip enzimlerin immobilizasyonunda kullanılmasını sağlar.

2.6. Aktivlik Tayini

2.6.1. Serbest Enzim Aktivlik Tayini

Serbest lakkazın aktifliğini tayin ederken Leonowicz ve Grzywnowicz tarafından verilen yöntem kullanıldı. Aktivlik tayini için tepkime 9 mL sitrat tamponuna (0,04 M, pH: 5,3) ilave olarak 1 mL siringaldazin çözeltisi (0,1 mM) ve 0,1 mL lakkaz çözeltisi (0,01 mg/mL) katılarak başlatıldı. Çözelti çalkalamalı su banyosunda 25°C' da 10 dakika bekletildi ve 12. dakikada 530 nm de absorbans değeri ölçülerek kaydedildi. Aşağıdaki bağıntı kullanılarak tepkime hızı, ölçülen absorbans değerleri ve kalibrasyon eğrisinin de eğimi ($\Delta A_{530}/\Delta C$) ile hesaplandı.

$$\text{Hız (V)} = \frac{\Delta C}{\Delta t} = \frac{\Delta A_{530}}{\Delta t} \times \frac{\Delta C}{\Delta A_{530}} \quad (2.1)$$

$$\frac{\Delta C}{\Delta A_{530}} = \frac{1}{\text{eğim}} \quad (2.2)$$

Yukarıdaki eşitlikte ΔC mM olarak siringaldazin derişimi, ΔA_{530} ($A_0 - A_t$) absorbanstaki, Δt zamandaki değışimi belirtir.

2.6.2. İmmobilize Enzim Aktivlik Tayini

İmmobilize lakkazın aktifliğini tayin ederken 1,0 g ECH, CDI ve NHS ile aktifleştirilmiş P(AAM-ko-AAc) hidrojenlerine immobilize edilmiş lakkaz enzimi hazırlanıp üzerine 9 mL sitrat tamponu (0,04 M, pH: 5,3), 1 mL siringaldazin çözeltisi (0,1 mM) ilave edildi. Karışımın çalkalamalı su banyosunda 25°C'da 10 dakika çalkalanması sağlandı ve 12. dakikada absorbans değerleri

ölçölüp kaydedildi. Ölçülen absorbens değerlerinden aktiflikler Bölüm 2.6.1' de anlatıldığı şekilde hesaplandı.

2.7. Enzim Aktifliğine pH Etkisi

2.7.1. Serbest Enzim Aktifliğine pH Etkisi

Serbest lakkaz aktifliğine pH' nın etkisini incelemek amacıyla farklı pH' larda (3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0) fosfat tamponları hazırlandı. Her bir pH'daki aktiflik tayini Bölüm 3.6.1' de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime esnasında, sıcaklık (25°C) ve siringaldazin başlangıç konsantrasyonu (0,1 mM) sabit tutuldu.

2.7.2. İmmobilize Enzim Aktifliğine pH Etkisi

İmmobilize lakkaz aktifliğine pH'nın etkisini incelemek amacı ile 1,0 g Epiklorhidrinle aktifleştirilmiş poli(akrilamit-ko-akrilik asit) (P(AAM-co-AAc)/ECH) , Karbodiimitle aktifleştirilmiş poli(akrilamit-ko-akrilik asit) (P(AAM-ko-AAc)/CDI ve N-hidroksisüksinimitle aktifleştirilmiş poli(akrilamit-ko-akrilik asit) (P(AAM-co-AAc)/NHS hidrojellerine immobilize edilen lakkaz enzimi ve farklı pH' larda (3,0; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0; 7,5; 8,0) fosfat tamponları hazırlanarak, her bir pH'da aktiflik tayini Bölüm 3.6.2'de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime esnasında, sıcaklık (25°C) ve siringaldazin konsantrasyonu (0,1 mM) sabit tutuldu.

2.8. Enzim Aktifliğine Sıcaklık Etkisi

2.8.1. Serbest Enzim Aktifliğine Sıcaklık Etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine sıcaklık etkisi farklı sıcaklıklarda (25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C) araştırıldı. Her bir sıcaklık için aktiflik tayini Bölüm 2.6.1' de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime esnasında, pH (5,3) ve siringaldazin konsantrasyonu (0,1 mM) sabit tutuldu.

2.8.2. İmmobilize Enzim Aktifliğine Sıcaklık Etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine sıcaklık etkisi incelemek amacı ile 1,0 g P(AAM-ko-AAc)/ECH, P(AAM-ko-AAc)/CDI ve P(AAM-ko-AAc)/NHS hidrojenlerine immobilize edilen lakkaz enzimi hazırlanarak farklı sıcaklıklarda (25°C, 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C, 60°C) aktiflik tayini Bölüm 2.6.2'de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime esnasında, pH (5,3) ve siringaldazin konsantrasyonu (0,1 mM) sabit tutuldu.

2.9. Enzim Aktifliğine Substrat Değişimi Etkisi

2.9.1. Serbest Enzim Aktifliğine Substrat Değişimi Etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine substrat konsantrasyonu etkisini incelemek için 4 farklı konsantrasyonlarda (0,025 mM, 0,050 mM, 0,075 mM, ve 0,100 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 2.6.1.'de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime esnasında pH (5,3), lakkaz konsantrasyonu (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu.

2.9.2. İmmobilize Enzim Aktifliğine Substrat Derişimi Etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine substrat konsantrasyonu etkisini incelemek için 1,0 g P(AAM-ko-AAc)/ECH, P(AAM-ko-AAc)/CDI ve P(AAM-ko-AAc)/NHS hidrojellerine immobilize edilen lakkaz enzimi ve 4 farklı konsantrasyonlarda (0,025 mM, 0,050 mM, 0,075 mM, 0,100 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 2.6.2' de anlatılan yöntemle göre yapıldı. Tepkime esnasında, pH (5,3) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu.

2.10. Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

2.10.1. Serbest Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

Serbest lakkazın aktifliğine depolama süresi etkisini incelemek için 0,04 M, pH 6,5 fosfat tamponunda, 0,01 mg/mL konsantrasyonda enzim çözeltisi hazırlandı. Bu çözelti buzdolabında 4°C'da saklandı ve bu çözeltiden belirli aralıklarla (0., 7., 15., 21., 24., 28., 35., 42., 50., 56., 64. gün) 0,1 mL örnek alınarak Bölüm 2.6.1.'de anlatılan yöntemle göre aktiflik tayini yapıldı. Tepkime esnasında, pH (5,3), siringaldazin derişimi (0,1 mM) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu.

2.10.2. İmmobilize Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

İmmobilize lakkazın aktifliğine depolama süresi etkisini incelemek amacıyla hazırlanan P(AAM-ko-AAc)/ECH, P(AAM-ko-AAc)/CDI ve P(AAM-ko-AAc)/NHS hidrojellerine immobilize edilen lakkaz enzimi buzdolabında 4°C'da saklandı. Bu hidrojellerden belirli aralıklarla (0., 6., 10., 17., 24., 31., 35. gün) 1,0 g örnek alınarak Bölüm 2.6.2.'de anlatılan yöntemle göre aktiflik tayini yapıldı. Tepkime esnasında, pH (5,3), siringaldazin konsantrasyonu (0,1 mM) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu.

2.11. İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi

İmmobilize lakkazın tekrar kullanılabilirliğini incelemek amacıyla 1 günde 5 kez tekrar kullanımı sağlandı. Bu amaçla 5,0 g P(AAM-ko-AAc)/ECH, P(AAM-ko-AAc)/CDI ve P(AAM-ko-AAc)/NHS hidrojellerine immobilize edilen lakkaz alınarak Bölüm 2.6.2' de anlatılan yöntemle göre aktiflik tayini yapıldı. Tepkime süresince, pH (5,3), siringaldazin konsantrasyonu (0,1 mM) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu.

2.12. Enzim Aktifliğine Termal İnaktivasyon Etkisi

2.12.1. İmmobilize Enzim Aktifliğine Termal İnaktivasyon Etkisi

P(AAM-ko-AAc)/ECH, P(AAM-ko-AAc)/CDI ve P(AAM-ko-AAc)/NHS hidrojellerine immobilize edilen lakkaz enziminin termal inaktivasyonu incelenmesi amacıyla iki farklı sıcaklıkta (40°C' da ve 50°C' da) ve farklı zaman aralıklarında (15- 75 dak.) immobilize lakkazın aktiflikleri Bölüm 2.6.2' de anlatılan yöntemle göre tayin edildi. Tepkime sırasında, pH (5,3), siringaldazin konsantrasyonu (0,1 mM) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu.

k_i , Birinci dereceden inaktivasyon sabitleri, eşitlik 2.3, 2.4 yardımıyla hesaplandı.

2.13. Enzim Aktifliği İle Metil Oranjın Renginin Giderilmesi

2.13.1. Serbest Enzim İle Metil Oranjın Renginin Giderilmesi

81 mL metil oranj çözeltisine ($3,0 \times 10^{-5}$ M) 9 mL lakkaz çözeltisi , SL, (0,4 mg/mL) katılarak manyetik karıştırıcıda düşük hızda 30°C' da bekletildi. 0., 15., 30., 45., 60. dakikalarda ve sonra birer saat aralıklarla 6 saat boyunca tepkime ortamından örnekler alınarak UV-görünür bölge

spektrofotometresinde 466 nm' de absorbands değerklerlerinin ölçümü sağlandı.

Serbest lakkaz için metil oranj renk giderme yüzdeleri aşğıdaki eşitlik kullanılarak hesaplandı.

$$\text{Renk Giderme (\%)} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad (2.6)$$

A_0 : t= 0 anındaki absorbands değeri

A_t : t anındaki absorbands değeri

2.13.2. İmmobilize Enzim İle Metil Oranj Renginin Giderilmesi

81 mL metil oranj çözeltisine ($3,0 \times 10^{-5}$ M) 9,0 g P(AAM-ko-AAc)/ECH, P(AAM-ko-AAc)/CDI ve P(AAM-ko-AAc)/NHS hidrojellerine immobilize edilen lakkaz eklenerek manyetik karıştırıcıda düşük hızda 30°C' da bekletildi. 0., 15., 30., 45., 60. dakikalarda ve sonra birer saat aralıklarla 6 saat boyunca tepkime ortamından örnekler alınarak UV-görünür bölge spektrofotometresinde 466 nm' de absorbands değerklerinin ölçümü sağlandı.

İmmobilize lakkazın metil oranj renk giderme yüzdeleri eşitlik 2.6 kullanılarak hesaplandı.

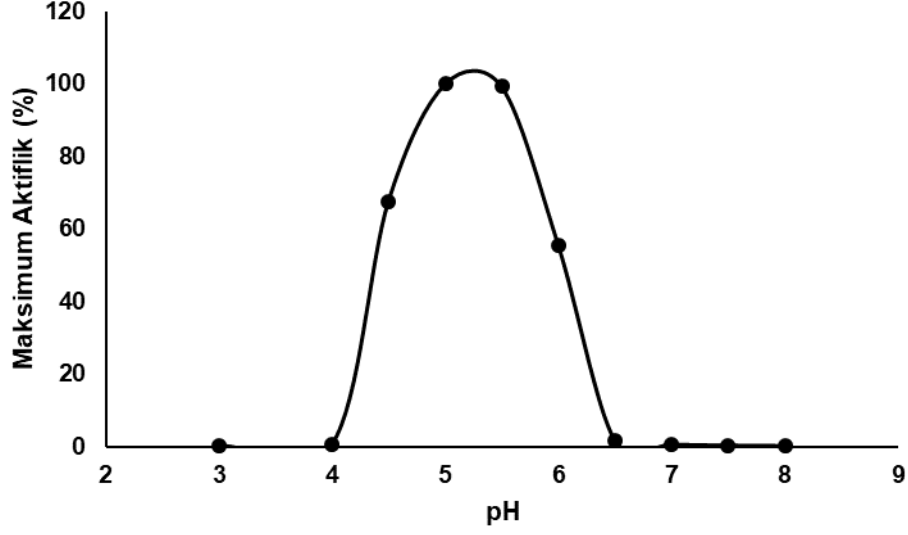
3. ARAŞTIRMA BULGULARI

3.1. Serbest Enzim Aktifliğine pH Etkisi

Serbest lakkaz aktifliğine pH' nın etkisi incelenmek amacıyla çeşitli pH' larda Bölüm 2.7.1' de anlatıldığı şekilde deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.1' de verildi. Serbest lakkaz enzimi için optimum pH 5,0 olarak bulundu ve maksimum aktifliğin pH ile değişimi Şekil 3.1' de gösterildi.

Çizelge 3.1. Serbest lakkazın aktifliğine pH etkisi

pH	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (x10 ⁻⁴ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
3,0	0,002	0,02	0,29
4,0	0,004	0,04	0,58
4,5	0,467	4,64	67,74
5,0	0,689	6,85	100,00
5,5	0,684	6,80	99,27
6,0	0,383	3,80	55,47
6,5	0,010	0,10	1,46
7,0	0,004	0,04	0,58
7,5	0,002	0,02	0,29
8,0	0,001	0,001	0,15



Şekil 3.1. Serbest lakkazın maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

Literatürde siringaldazin substratı kullanarak *Agoricus bisperus* için optimum pH 6 ve *Trametes versicolor* içinse optimum pH 5 olarak bulunmuştur [74,86].

3.2. İmmobilize Enzim Aktifliğine pH Etkisi

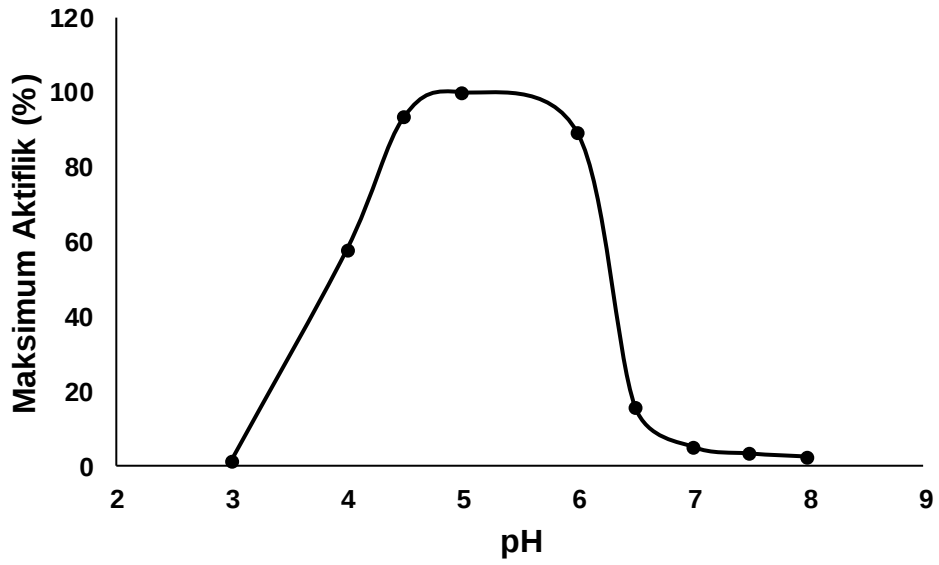
3.2.1. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Epiklorhidrin Hidrojeline

İmmobilize Edilen Lakkaz Aktifliğine pH Etkisi

P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisi incelenmek amacıyla Bölüm 2.7.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.2'de verildi. P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 5,5 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 3.2'de gösterildi

Çizelge 3.2. P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine pH etkisi

pH	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	Maksimum Aktiflik (%)
3,0	0,007	0,26	1,71
4,0	0,416	6,12	40,34
4,5	0,676	9,63	63,42
5,0	0,723	12,14	79,99
6,0	0,623	14,14	93,13
6,5	0,112	15,18	100,00
7,0	0,034	10,28	67,76
7,5	0,021	1,94	12,80
8,0	0,015	0,24	1,60



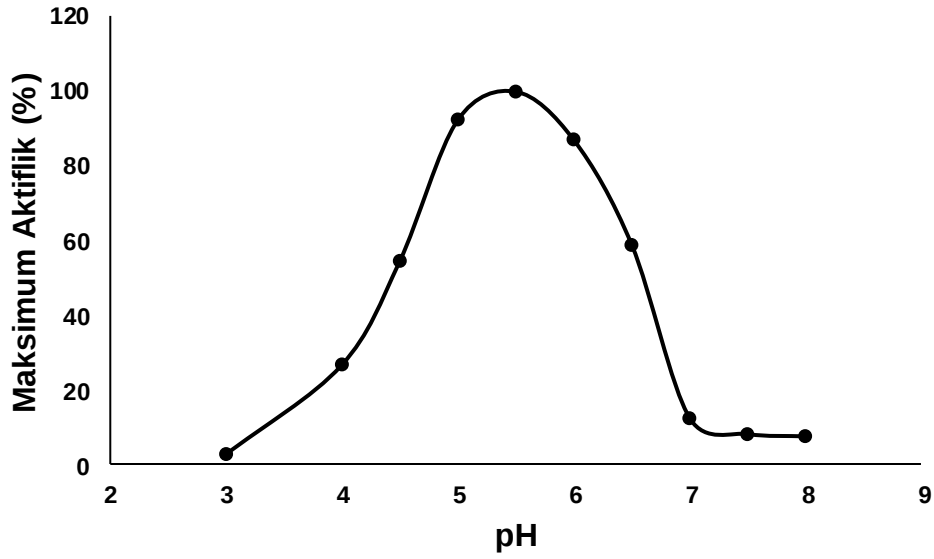
Şekil 3.2. P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

3.2.2. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Karbodiimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Aktivliğine pH Etkisi

P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisi incelenmek amacıyla Bölüm 2.7.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.3' de verildi. P(AAm-co-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 5,5 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.3. P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine pH etkisi

pH	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (x10 ⁻⁴ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
3,0	0,011	0,11	2,30
4,0	0,127	1,26	26,36
4,5	0,261	2,59	54,18
5,0	0,444	4,41	92,26
5,5	0,481	4,78	100,00
6,0	0,419	4,16	87,03
6,5	0,283	2,81	58,79
7,0	0,058	0,58	12,13
7,5	0,038	0,38	7,95
8,0	0,035	0,35	7,32



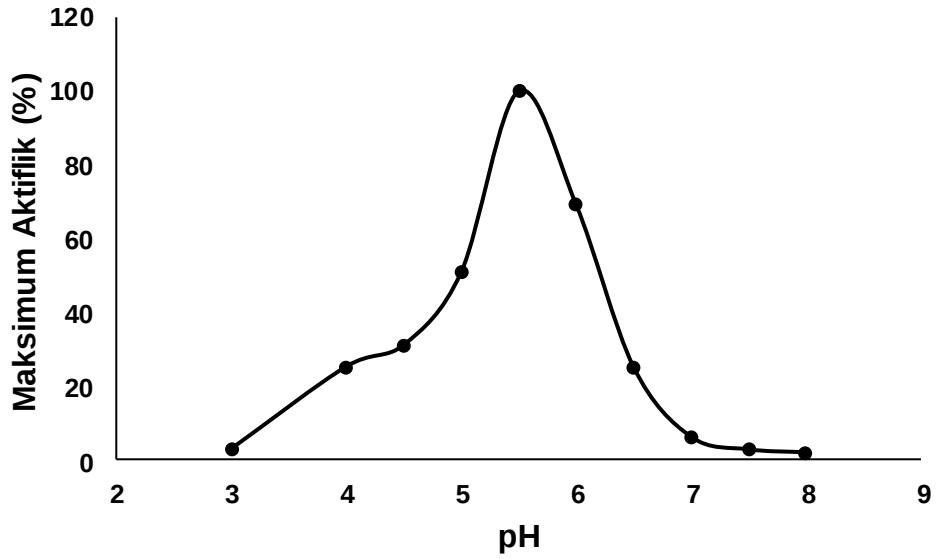
Şekil 3.3. P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

3.2.3. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/N-Hidroksisüksinimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Aktivliğine pH Etkisi

P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi aktifliğine pH'nın etkisi incelenmek amacıyla Bölüm 2.7.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.4'de verildi. P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için optimum pH 5,5 olarak bulundu ve maksimum aktifliğinin pH ile değişimi Şekil 3.4'de gösterildi.

Çizelge 3.4. P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine pH etkisi

pH	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (x10 ⁻⁴ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
3,0	0,022	0,21	2,86
4,0	0,186	1,85	25,20
4,5	0,229	2,28	31,06
5,0	0,375	3,73	50,82
5,5	0, 738	7,34	100,00
6,0	0, 511	5,08	69,21
6,5	0,185	1,84	25,07
7,0	0,045	0,45	6,13
7,5	0,020	0,20	2,72
8,0	0,014	0,14	1,91



Şekil 3.4. P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkaz enziminin maksimum aktifliğinin pH ile değişimi

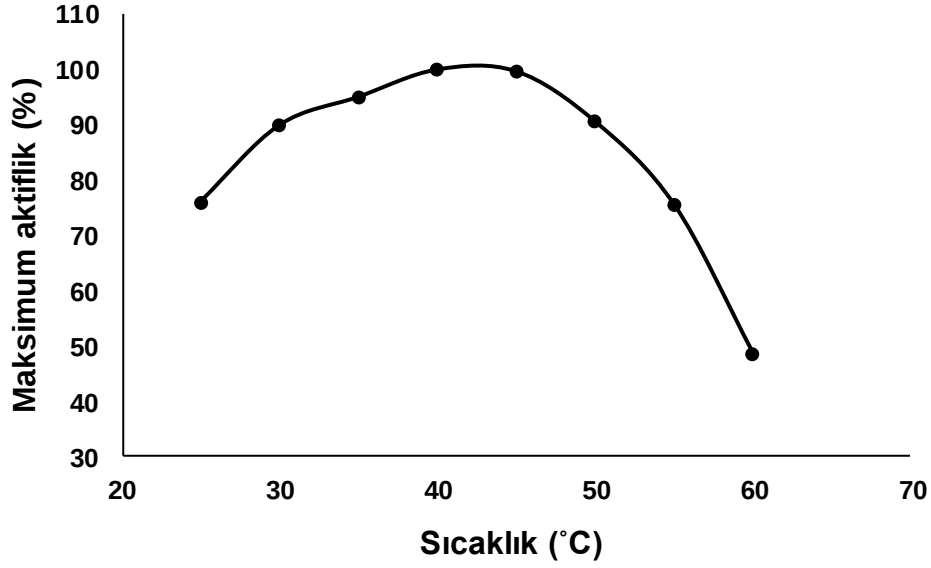
3.3. Serbest Enzim Aktifliğine Sıcaklık Etkisi

Serbest lakkaz aktifliğine sıcaklık etkisi incelenmek amacıyla Bölüm 2.8.1’de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.5’de verildi ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 3.5’de gösterildi.

Serbest lakkaz enzimi için optimum sıcaklık 40°C bulundu. 40°C’ın altındaki ve üstündeki çalışılan sıcaklıklarda enzim aktifliğinde azalmalar meydana geldi.

Çizelge 3.5. Serbest lakkazın aktifliğine sıcaklık etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (x10 ⁻⁴ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
25	0,463	4,60	76,03
30	0,547	5,44	89,92
35	0,578	5,75	95,04
40	0,609	6,05	100,00
45	0,607	6,03	99,67
50	0,551	5,48	90,58
55	0,460	4,57	75,54
60	0,296	2,94	48,60



Şekil 3.5. Serbest lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

Literatürde *Agoricus bisperus*'dan elde edilen lakkazın siringaldazin sustratı kullanarak optimum sıcaklığı 45 °C ve *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazın ABTS sustratı kullanarak optimum sıcaklığı 40 °C bulunmuştur [74,87].

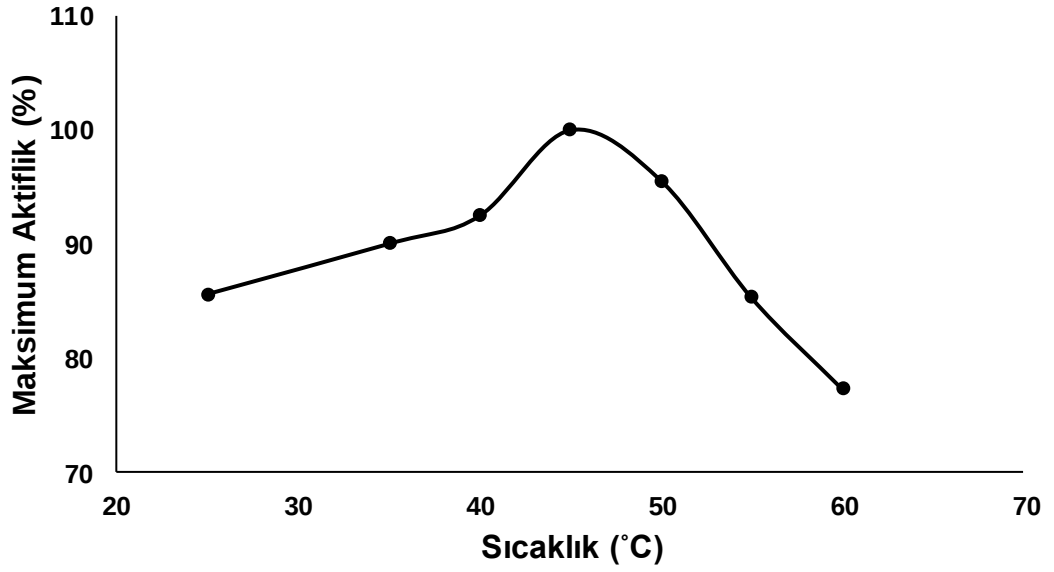
3.4. İmmobilize Enzim Aktifliğine Sıcaklık Etkisi

3.4.1. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Epiklorhidrin Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Sıcaklık Etkisi

P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkaz enziminin aktifliğine sıcaklık etkisi incelenmek amacıyla Bölüm 2.8.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.6'da verildi. P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 45°C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 3.6' da gösterildi.

Çizelge 3.6. P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklık etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (x10 ⁻⁴ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
25	0,526	5,23	85,60
35	0,553	5,50	90,02
40	0,568	5,65	92,47
45	0,615	6,11	100,00
50	0,559	5,26	86,09
55	0,524	5,21	85,27
60	0,475	4,72	77,25



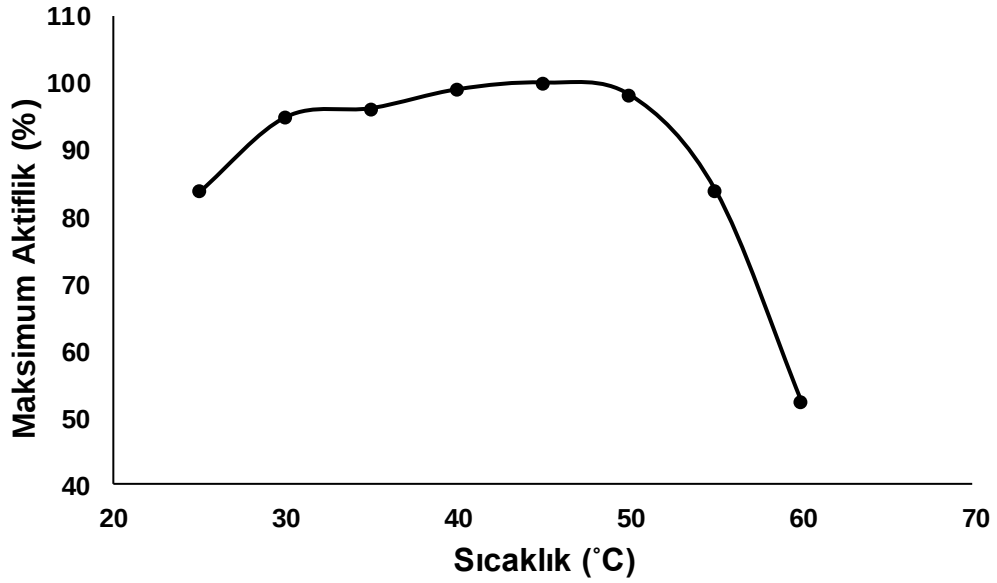
Şekil 3.6. P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

3.4.2. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Karbodiimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Sıcaklık Etkisi

P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklık etkisi incelenmek amacıyla Bölüm 2.8.2’de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.7’ de verildi. P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 45°C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 3.7’ de gösterildi.

Çizelge 3.7. P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklık etkisi

Sıcaklık (°C)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
25	0,506	5,03	83,69
30	0,573	5,70	94,84
35	0,581	5,78	96,17
40	0,599	5,95	99,00
45	0,605	6,01	100,00
50	0,593	5,90	98,17
55	0,507	5,04	83,86
60	0,316	3,14	52,25



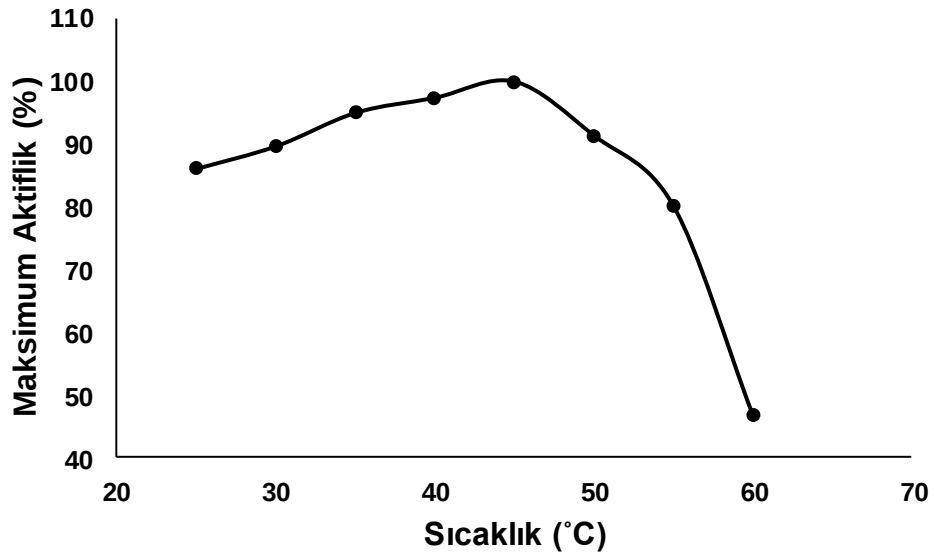
Şekil 3.7. P(AAm-ko-AAC)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

3.4.3. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/N-Hidroksisüksinimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Sıcaklık Etkisi

P(AAm-ko-AAC)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklık etkisi incelenmek amacıyla Bölüm 2.8.2’de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Elde edilen absorbans değişimleri ve aktiflik değerleri Çizelge 3.8’de verildi. P(AAm-ko-AAC)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık 45°C olarak bulundu ve maksimum aktifliklerin sıcaklık ile değişimi Şekil 3.8’de gösterildi.

Çizelge 3.8. P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine sıcaklık etkisi

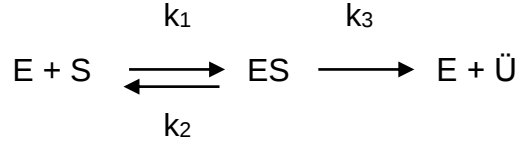
Sıcaklık (°C)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
25	0,504	5,01	86,08
30	0,525	5,22	89,69
35	0,556	5,53	95,02
40	0,570	5,67	97,42
45	0,585	5,82	100,00
50	0,535	5,32	91,41
55	0,470	4,67	80,24
60	0,275	2,73	46,91



Şekil 3.8. P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin sıcaklık ile değişimi

3.5. Serbest Enzim Aktifliğine Substrat Derişimi Etkisi

Enzim ve substratarasındaki reaksiyon mekanizması aşağıdaki şekilde ifade edilir.



Bu eşitlikte; E enzimi, S substratı, ES enzim – substrat kompleksini, Ü ürünü gösterir. Enzim tepkime hızını Michaelis – Menten Eşitliği ile hesaplanır.

$$V_o = \frac{V_{\text{mak}} \times S}{K_m + S} \quad (3.1)$$

Bu mekanizmaya göre Michaelis-Menten sabiti aşağıda verilmiştir.

$$K_m = \frac{k_2 + k_3}{k_1} \quad (3.2)$$

V_o : Başlangıç hızı

V_{mak} : Maksimum hız

K_m : Michaelis-Menten sabiti

S: Substrat derişimi

Michaelis-Menten Eşitliğinin düzenlenmesi ile Lineweaver-Burk Eşitliği elde edilir:

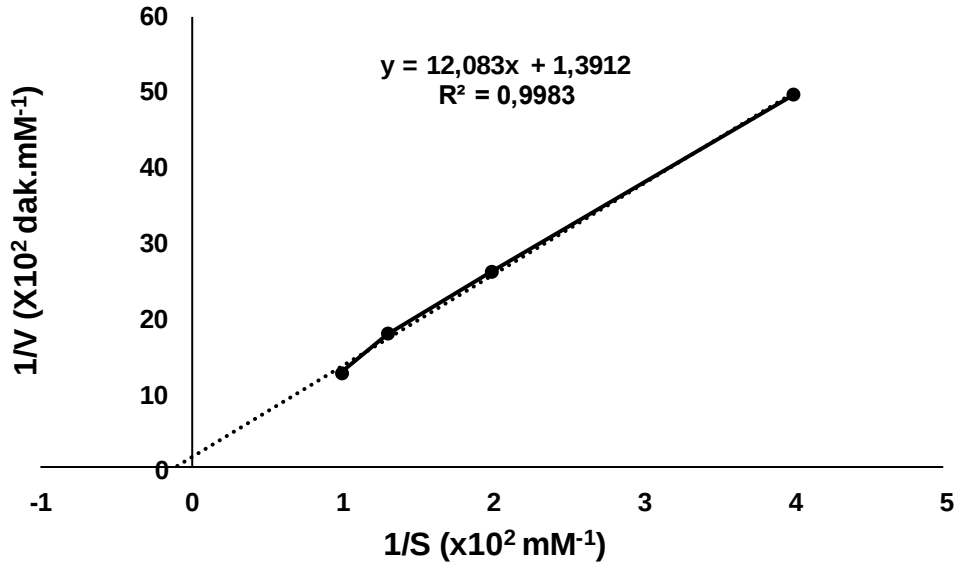
$$\frac{1}{V} = \frac{K_m}{V_{\text{mak}}} \times \frac{1}{S} + \frac{1}{V_{\text{mak}}} \quad (3.3)$$

Lineweaver- Burk Eşitliğine göre, $1/S$ ' nin $1/V$ ' ye karşı çizilen grafiği bir doğru verir. Bu doğrunun y- kayması $1/V_{\text{mak}}$ değerini verir ve maksimum hız hesaplanır. Maksimum hız bulunduktan sonra eğimden (eğim= K_m/V_{mak}) veya x- kaymasından K_m hesaplanır.

Serbest lakkaz aktifliğinde substrat derişiminin etkisi incelenmek amacıyla 4 farklı derişimde (0,100-0,025 mM) siringaldazin çözeltileri hazırlanarak, enzim aktiflik tayini Bölüm 2.9.1'de anlatılan yöntemle yapıldı. Tepkime süresi (12 dakika), pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu. Çizelge 3.9' da verilen $1/S$ ve $1/V$ değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile serbest enzim için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.9). Serbest enzimin K_m değeri $8,69 \times 10^{-3}$ mM ve V_{mak} değeri $7,19 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 3.9. Serbest lakkazın aktifliğine substrat derişimi etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	$1/S$ ($\times 10^2 \text{mM}^{-1}$)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	$1/V$ ($\times 10^2$ dak.mM ⁻¹)
10	1,0	0,798	7,93	12,61
7,5	1,3	0,565	5,62	17,70
5	2,0	0,386	3,84	26,04
2,5	4,0	0,203	2,02	49,50



Şekil 3.9. Serbest lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği

Literatürde *Agoricus bisperus*' dan elde edilen lakkaz için siringaldazin substratı kullanarak serbest lakkazın K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 0,088 mM ve $2,83 \times 10^{-3}$ mM.min⁻¹ olarak bulunurken *Cerrena unicolor*' dan elde edilen lakkaz için ABTS substratı kullanarak serbest lakkazın K_m ve V_{max} değerleri sırasıyla 25,9 mM ve 123,0 mM.min⁻¹ olarak bulunmuştur [87].

3.6. İmmobilize Enzim Aktifliğine Substrat Değişimi Etkisi

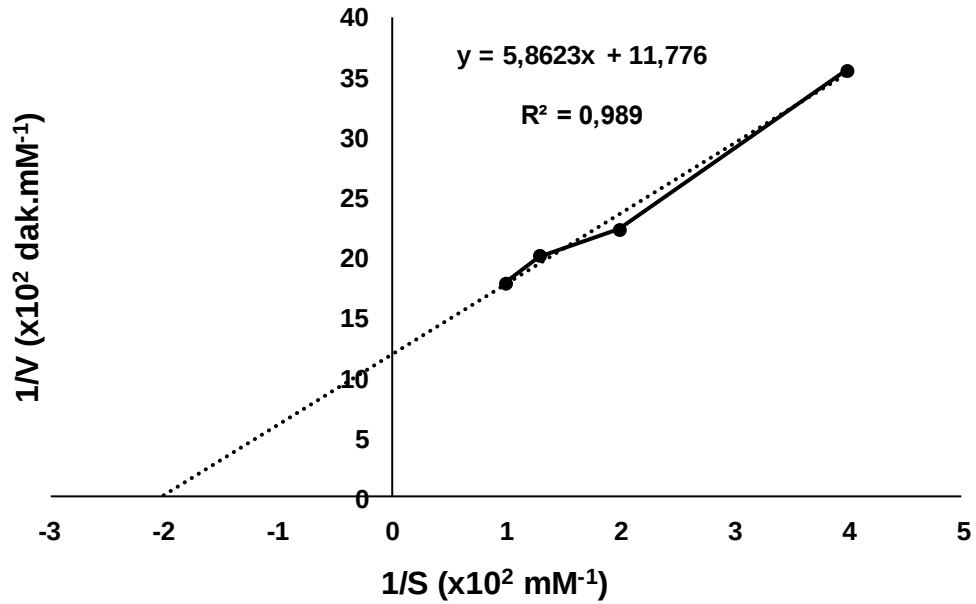
3.6.1. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Epiklorhidrin Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Substrat Değişimi Etkisi

P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat dereişimi etkisini incelemek için Bölüm 2.9.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Tepkime süresi (12 dakika), pH (5,3), lakkaz konsantrasyonu (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu. Çizelge 3.10' da verilen 1/S ve 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği

izildi (Şekil 3.10). P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için K_m değeri $0,50 \times 10^{-3}$ mM ve V_{mak} değeri $0,85 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 3.10. P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğinde substrat derişimi etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S ($\times 10^2$ mM ⁻¹)	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	1/V ($\times 10^2$ dak.mM ⁻¹)
10,0	1,0	0,565	5,62	17,81
7,5	1,3	0,501	4,98	20,08
5,0	2,0	0,451	4,48	22,32
2,5	4,0	0,283	2,81	35,55



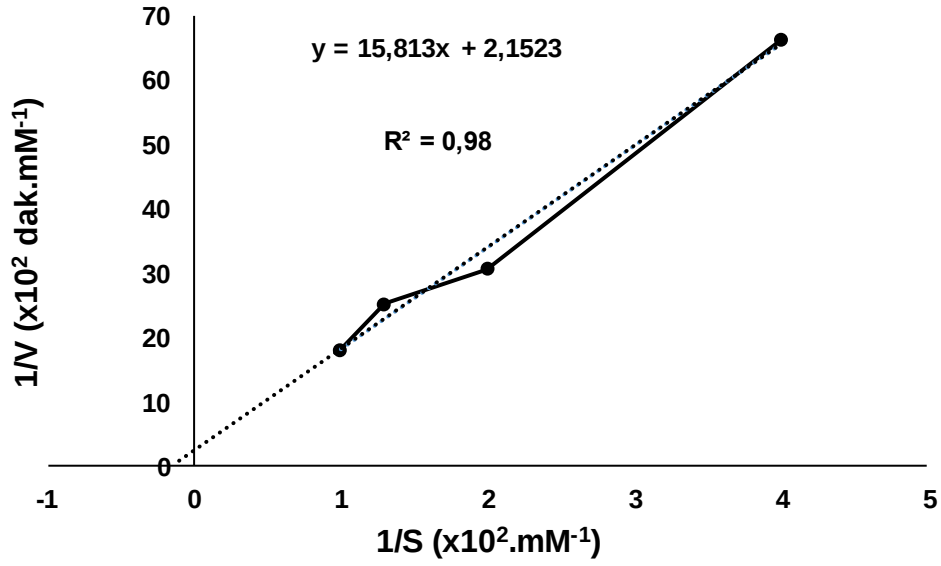
Şekil 3.10. P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

3.6.2. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Karbodiimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Substrat Değişimi Etkisi

P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat değişimi etkisi incelenmek amacıyla Bölüm 2.9.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Tepkime süresi (12 dakika), pH (5,3), lakkaz değişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu. Çizelge 3.11'de verilen 1/S ve 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkaz için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.11). P(AAm-co-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için, K_m değeri $7,35 \times 10^{-3}$ mM ve V_{mak} değeri $4,65 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 3.11. P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat değişimi etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S ($\times 10^2$ mM ⁻¹)	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	1/V ($\times 10^2$ dak.mM ⁻¹)
10,0	1,0	0,561	5,58	17,92
7,5	1,3	0,400	3,98	25,13
5,0	2,0	0,329	3,27	30,58
2,5	4,0	0,152	1,51	66,23



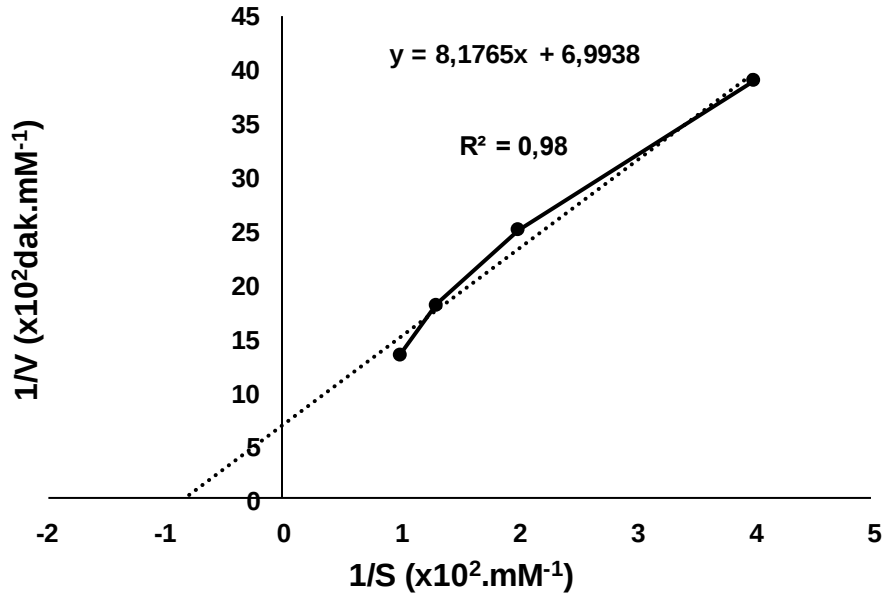
Şekil 3.11. P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiği

3.6.3. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/N-Hidroksisüksinimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Substrat Değişimi Etkisi

P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat değişimi etkisi incelenmek amacıyla Bölüm 2.9.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Tepkime süresi (12 dakika), pH (5,3), lakkaz derişimi (0,01 mg/mL) ve sıcaklık (25°C) sabit tutuldu. Çizelge 3.12'de verilen 1/S ve 1/V değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkaz enzimi için Lineweaver-Burk grafiği çizildi (Şekil 3.12). P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkaz için, K_m değeri $1,17 \times 10^{-3}$ mM ve V_{mak} değeri $1,43 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.

Çizelge 3.12. P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine substrat derişimi etkisi

S ($\times 10^{-3}$ mM)	1/S ($\times 10^2$ mM ⁻¹)	Absorbans değişimi (ΔA_{530})	Aktiflik (V) ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	1/V ($\times 10^2$ dak.mM ⁻¹)
10,0	1,0	0,742	7,38	13,55
7,5	1,3	0,555	5,52	18,11
5,0	2,0	0,400	3,98	25,12
2,5	4,0	0,258	2,56	39,06



Şekil 3.12. P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkazın Lineweaver-Burk grafiğı

Serbest ve immobilize edilmiş lakkaz enzimleri için K_m ve V_{mak} verilerinin tamamı Çizelge 3.13' de verilmiştir.

Çizelge 3.13. Serbest lakkaz ve immobilize lakkazlar için K_m ve V_{mak} değerleri

Serbest ve immobilize lakkaz	K_m ($\times 10^{-3}$ mM)	V_{mak} ($\times 10^{-3}$ mM.dak ⁻¹)
Serbest lakkaz	8,69	7,19
P(AAm-ko-AAc)/CDI	7,35	4,65
P(AAm-ko-AAc)/NHS	1,17	1,43
P(AAm-ko-AAc)/ECH	0,50	0,85

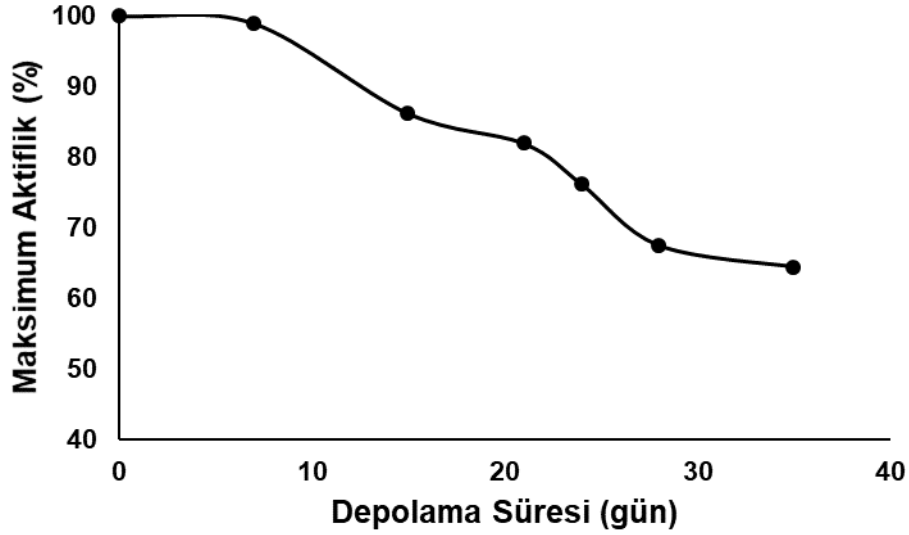
Literatürde *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazın kataliz özelliğinin artırılması amacıyla gluteraldehit aktihleştiricisi kullanarak çitosan mikroküreleri üzerine yaptıkları immobilizasyonda ABTS substratı kullanarak K_m ve V_{mak} parametrelerine bakıldığında K_m depğerelerinin serbest lakkaza oranla düştüğü ancak V_{max} değerin arttığı sonucuna ulaşıldı [88].

3.7. Serbest Enzimin Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

Serbest lakkaz aktifliğinde depolama süresinin etkisi incelenmek için, 4°C' da saklanan lakkaz çözeltilerinin 31 gün boyunca Bölüm 2.10.1'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Serbest enzimin maksimum aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 3.14 ve Şekil 3.13'de gösterildi.

Çizelge 3.14. Serbest lakkaz aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (x10 ⁻⁴ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
0	0,662	6,58	100,00
7	0,655	6,51	98,94
15	0,570	5,67	86,17
21	0,542	5,39	81,91
24	0,504	5,01	76,14
28	0,447	4,44	67,48
35	0,427	4,24	64,44
42	0,384	3,82	58,05
50	0,228	2,27	34,50
56	0,216	2,15	32,67
64	0,194	1,93	29,33



Şekil 3.13. Serbest lakkaz maksimum aktifliğinin depolama süresi ile Değişimi

4°C'da depolama süresinin 35. gününde serbest enzimin başlangıç aktifliğinin sadece %64.44' ünü koruduğu gözlemlendi. Literatürde *Agaricus bisporus*'dan elde edilen lakkazın 4°C'da 27 gün depolama sonunda serbest lakkaz başlangıç aktivitesini tamamen kaybederken *Trametes versicolor*/ BL-04' den elde edilen lakkazın 4°C'da 30 gün depolanması sonucunda aktifliğinin % 46,5'ini koruduğunu bulmuşlardır [74,88].

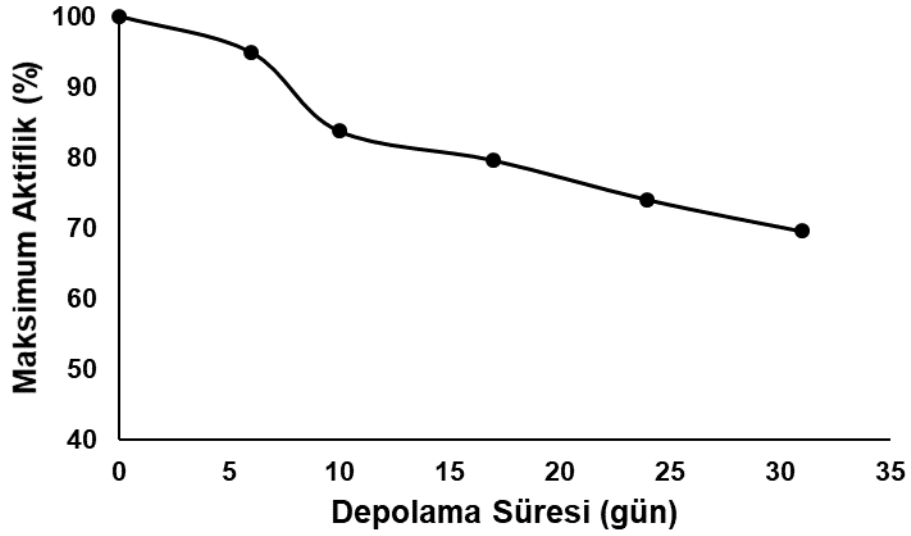
3.8. İmmobilize Enzim Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

3.8.1. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Epiklorhidrin Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi incelenmek amacıyla, 4°C'da saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 35 gün boyunca Bölüm 2.10.2'de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresiyle değişimi Çizelge 3.15 ve Şekil 3.14'de gösterildi.

Çizelge 3.15. P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
0	0,632	6,28	100,00
6	0,600	5,96	94,90
10	0,529	5,26	83,76
17	0,503	5,00	79,62
24	0,468	4,65	74,04
31	0,445	4,37	69,59



Şekil 3.14. P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresi ile değişimi

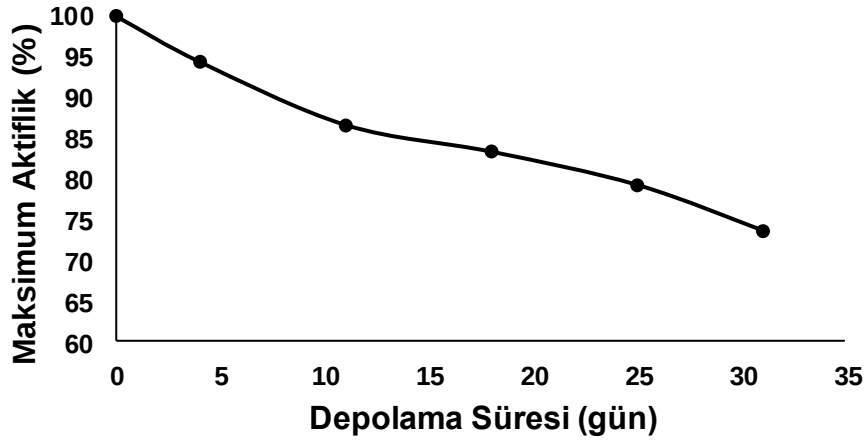
4°C’da depolama süresinin 31. gününde İmmobilize enzimin başlangıç aktifliğinin % 69,59’ unu koruduğu gözlemlendi.

3.8.2. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Karbodiimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktivliğine Depolama Süresinin Etkisi

P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktivliğine depolama süresinin etkisi incelenmek amacıyla, 4°C'da saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 38 gün boyunca Bölüm 3.10.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktivliğine depolama süresiyle değişimi Çizelge 3.16 ve Şekil 3.15' de gösterildi.

Çizelge 3.16. P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktivliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktivlik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktivlik (%)
0	0,736	7,32	100,00
4	0,695	6,91	96,40
11	0,660	6,56	86,62
18	0,614	6,10	83,33
25	0,583	5,80	79,23
31	0,542	5,39	73,63



Şekil 3.15. P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

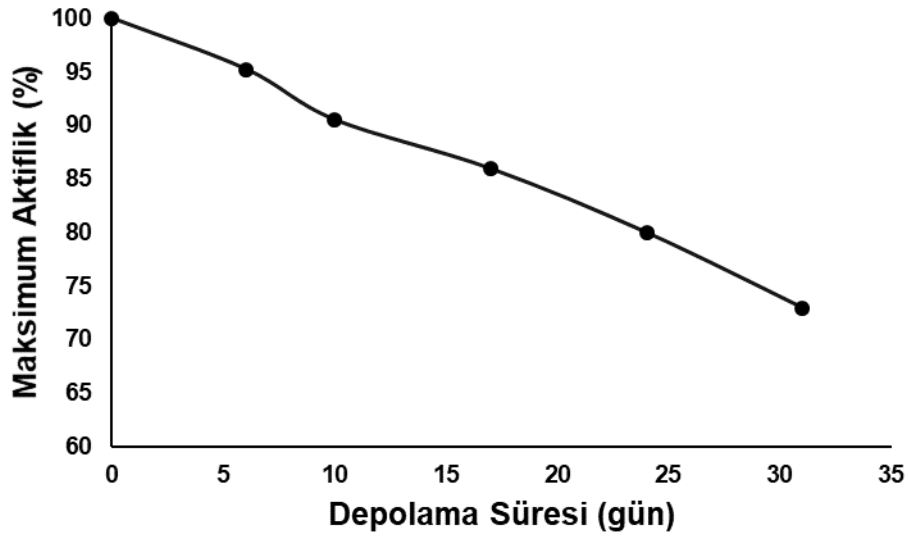
4°C'da depolama süresinde 31. gününde immobilize enzimin başlangıç aktifliğinin % 73,63' ünü koruduğu gözlemlendi.

3.8.3. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/N-Hidroksisüksinimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkazın Aktifliğine Depolama Süresinin Etkisi

P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi incelenmek amacıyla, 4°C' da saklanan immobilize enzimin belirli aralıklarla 31 gün boyunca Bölüm 2.10.2' de anlatılan yöntem ile aktiflikleri tayin edildi. P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğinin depolama süresiyle değişimi Çizelge 3.17 ve Şekil 3.16' da gösterildi.

Çizelge 3.17. P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğine depolama süresinin etkisi

Zaman (gün)	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
0	0,572	5,69	100,00
6	0,545	5,42	95,25
10	0,518	5,15	90,51
17	0,492	4,89	85,94
24	0,458	4,55	79,96
31	0,417	4,15	72,93



Şekil 3.16. P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkazın aktifliğinin depolama süresi ile değişimi

4°C'da depolama süresinin 31. gününde immobilize enzimin başlangıç aktifliğinin yaklaşık % 73' ünü koruduğu gözlemlendi.

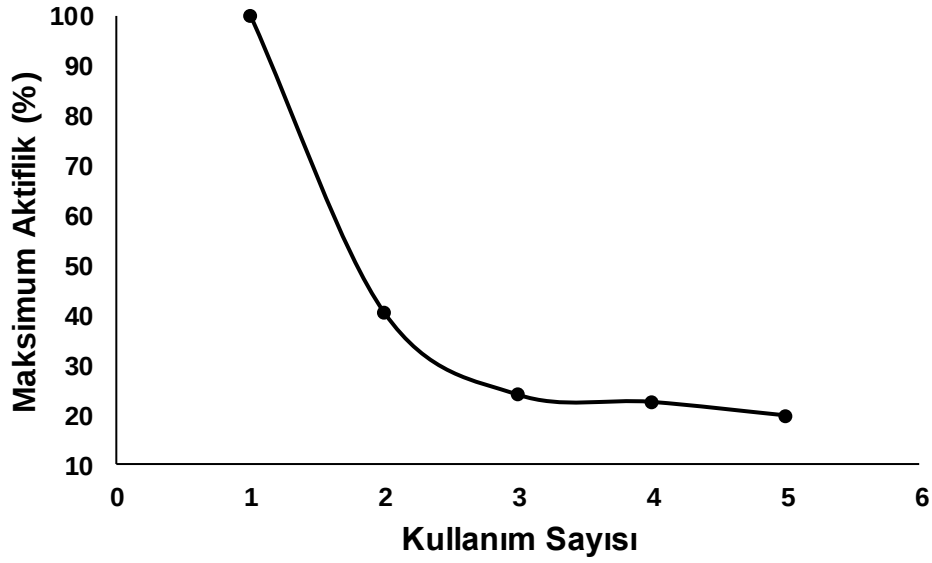
3.9. İmmobilize Enzim Aktifliğinin Kullanım Sayısına Bağlı Değişim

3.9.1. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Epiklorhidrin Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi

P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkaz 1 gün içinde 5 kez kullanılarak Bölüm 2.11' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. İmmobilize enzimin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 3.18 ve Şekil 3.17' de gösterildi.

Çizelge 3.18. P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
1	0,290	2,88	100,00
2	0,117	1,16	40,27
3	0,115	1,14	23,75
4	0,108	1,07	22,29
5	0,095	0,94	19,58



Şekil 3.17. P(AAm-co-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

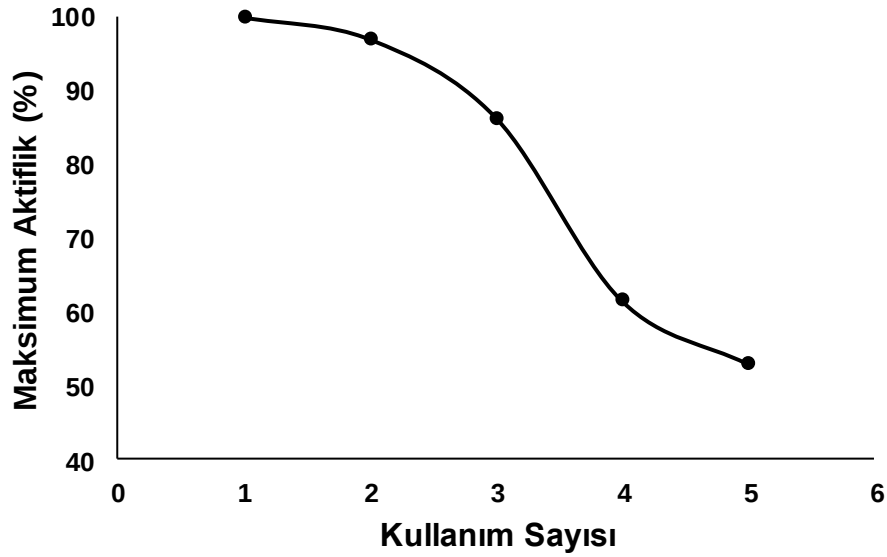
5 kez kullanım sonunda, P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkazın başlangıç aktifliğinin %19 'unu koruduğu gözlemlendi.

3.9.2. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Karbodiimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi

P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkaz 1 gün içinde 5 kez kullanılarak Bölüm 2.11' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. İmmobilize enzimin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 3.19 ve Şekil 3.18' da gösterildi.

Çizelge 3.19. P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktivliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans (A_{530})	Aktiflik ($\times 10^{-4}$ mM.dak $^{-1}$)	Maksimum Aktiflik (%)
1	0,304	3,02	100,00
2	0,295	2,93	97,02
3	0,263	2,61	86,42
4	0,187	1,86	61,59
5	0,161	1,60	52,98



Şekil 3.18. P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkazın maksimum aktivliğinin kullanım sayısı ile değişimi

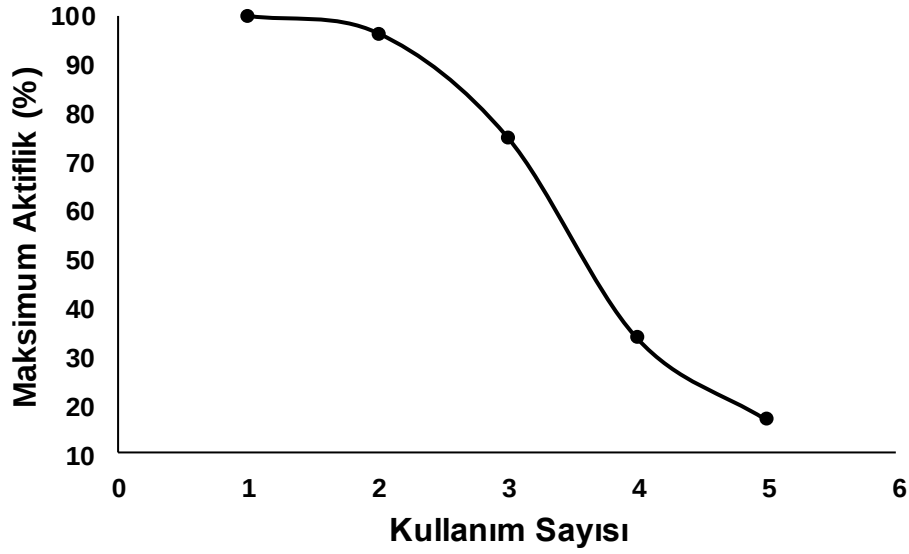
5 kez kullanım sonunda, P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkazın başlangıç aktivliğinin %52' sini korunduğu gözlemlendi.

3.9.3. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/N-Hidroksisüksinimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz Aktifliğinin Kullanım Sayısı ile Değişimi

P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkaz 1 gün içinde 5 kez kullanılarak Bölüm 2.11' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. İmmobilize enzimin maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi Çizelge 3.20 ve Şekil 3.19' de gösterildi.

Çizelge 3.20. P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkaz aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

Kullanım sayısı	Absorbans (A ₅₃₀)	Aktiflik (x10 ⁻⁴ mM.dak ⁻¹)	Maksimum Aktiflik (%)
1	0,459	4,56	100,00
2	0,443	4,40	96,49
3	0,345	3,43	75,22
4	0,156	1,55	33,99
5	0,078	0,78	17,11



Şekil 3.19. P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkazın maksimum aktifliğinin kullanım sayısı ile değişimi

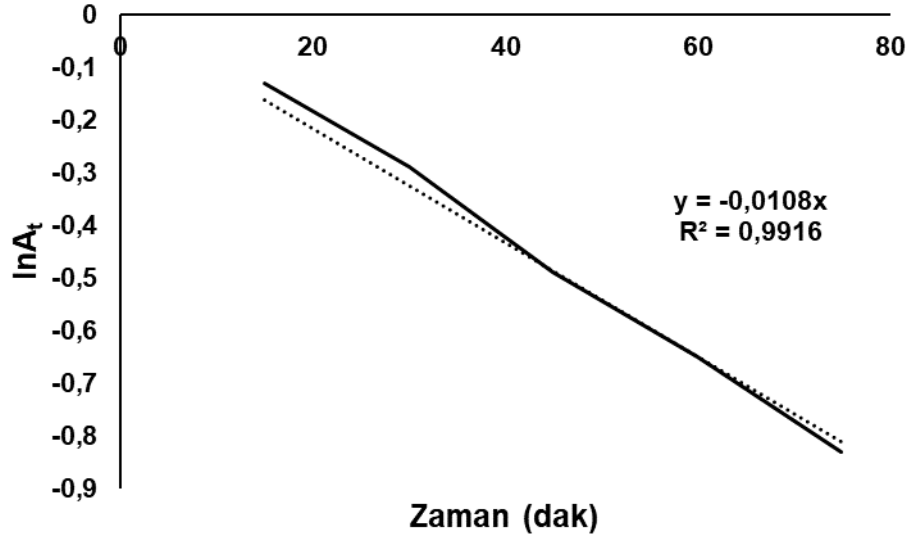
5 kez kullanım sonunda, P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkazın başlangıç aktifliğinin % 17' sini korunduğu gözlemlendi.

Literatürde bazı immobilize örneklerin 35 kez kullanım sonrasında %28 ve %58 oranında başlangıç aktifliklerini koruduğu, kristal moru içeren bazı sentetik boyaların renklerinin giderilmesi için aLjinat-jelatin jel karışımına lakkaz immobilize edilmiş ve 5 kez kullanımdan sonra aktivitesinin %85'ini koruduğu gözlemlendi [74,89].

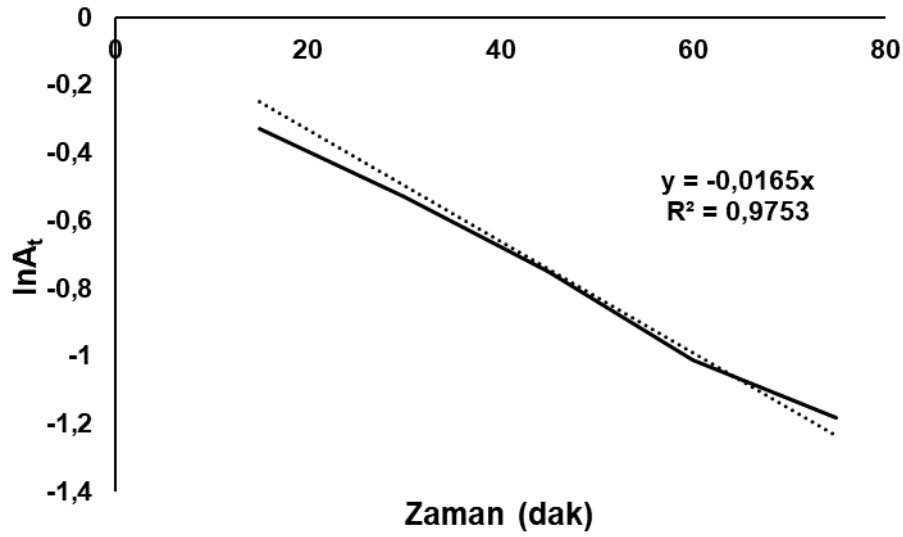
3.10. İmmobilize Enzim Aktifliğine Termal İnaktivasyon Etkisi

P(AAM-ko-AAc)/ECH, P(AAM-ko-AAc)/CDI ve P(AAM-ko-AAc)/NHS hidrojellerine immobilize edilen lakkaz enziminin termal inaktivasyonu incelenmek amacıyla 2.12.1' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı. Birinci dereceden termal inaktivasyon sabitleri $\ln A_t - t$ grafiklerinin eğiminden hesaplandı. 40 °C' da P(AAM-ko-AAc)/CDI, P(AAM-ko-AAc)/NHS

immobilize lakkazların, k_i değerlerini hesaplamak üzere $\ln A_t$ ' nin t ile değişimi sırasıyla Şekil 3.22, Şekil 3.23' de gösterildi.

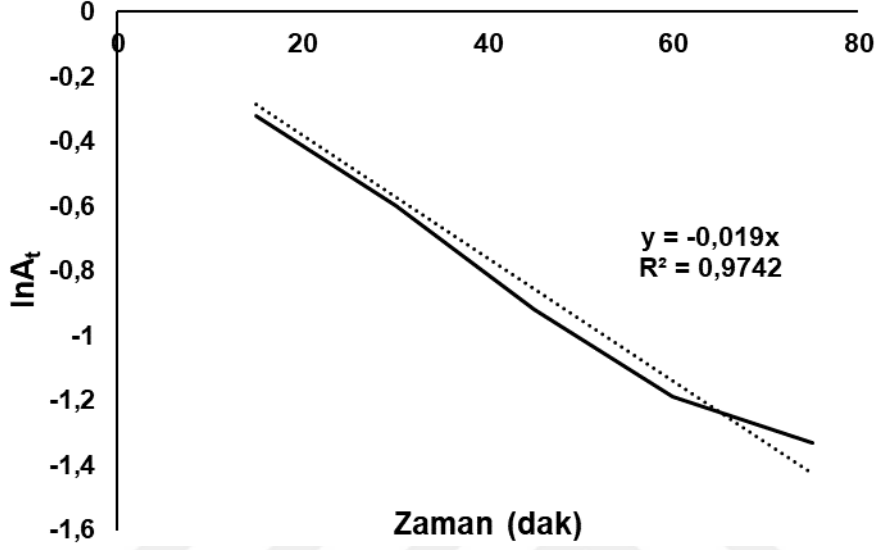


Şekil 3.20. 40 °C' da P(AAM-ko-AAc)/CDI için $\ln A_t - t$ grafiği

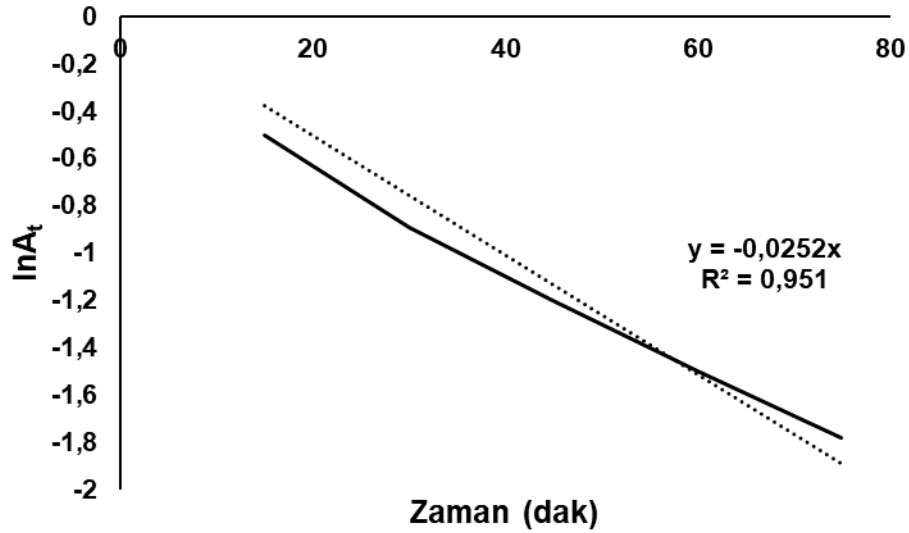


Şekil 3.21. 40 °C' da P(AAM-ko-AAc)/NHS için $\ln A_t - t$ grafiği

50 °C’ da P(AAM-ko-AAc)/CDI, P(AAM-ko-AAc)/NHS immobilize lakkazların, k_i değerlerini hesaplamak üzere $\ln A_t$ ’ nin t ile değişimi sırasıyla Şekil 3.24, Şekil 3.25’ de gösterildi.



Şekil 3.22. 50 °C’ da P(AAM-ko-AAc)/CDI için $\ln A_t - t$ grafiği



Şekil 3.23. 50 °C’ da P(AAM-ko-AAc)/NHS için $\ln A_t - t$ grafiği

Serbest ve immobilize lakkazlar için 40 °C ve 50 °C’ da hesaplanan k_i değerleri Çizelge 3.21’ de verildi.

Çizelge 3.21. Immobilize lakkazlar için k_i değerleri

İmmobilize lakkazlar	k_i (dak^{-1})	
	40°C	50°C
P(AAm-ko-AAc)/CDI	0,0108	0,0190
P(AAm-ko-AAc)/NHS	0,0165	0,0252

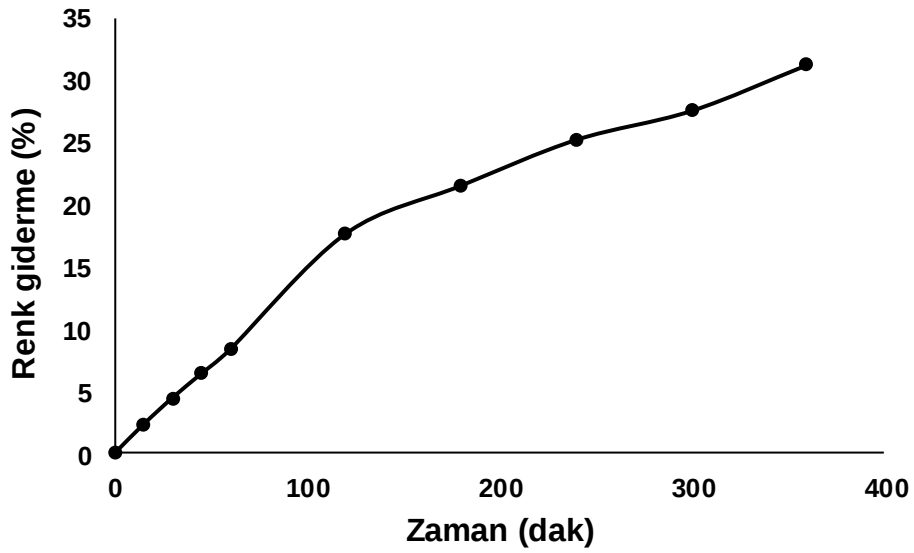
İmmobilize lakkazların sıcaklık değerlerinin 40°C’ dan 50°C’ a doğru artış göstermesi ile k_i değerlerinin de arttığı tespit edildi. İmmobilize lakkazların sıcaklık artışına bağlı olarak oluşabilecek denatürasyonlara karşı daha dirençli olabileceği kanıtlanmış oldu. Literatürde *Trametes versicolor*’dan elde edilen lakkazı ABTS substratı kullanarak Termal İnaktivasyon sabiti immobilize lakkaz için 0,02 olarak bulundu. Bu değer serbest lakkazdan 18 kat daha aşağıda olarak bulundu [76].

3.11. Serbest Enzim İle Metil Oranj Renginin Giderilmesi

Serbest lakkaz kullanılarak metil oranj renk giderilmesi incelenmek amacıyla düşük hızda 30°C’ da farklı zamanlarda Bölüm 2.13.1’ de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve renk giderme yüzdeleri Çizelge 3.22 ve Şekil 3.24’ de gösterildi.

Çizelge 3.22. Serbest lakkaz ile metil oranjin renginin giderilme yüzdeleri

Zaman (dak)	Absorbans (A_{466})	Renk Giderme (%)
0	0,514	0
15	0,502	2,33
30	0,491	4,47
45	0,481	6,42
60	0,471	8,37
120	0,423	17,70
180	0,403	24,59
240	0,384	25,29
300	0,372	27,63
360	0,353	31,32



Şekil 3.24. Serbest lakkaz ile metil oranjin renginin giderilme yüzdelerinin zamanla değişimi

Şekil 3.24' de görüldüğü gibi 6 saat sonunda serbest lakkaz metil oranj rengini %31 oranında gidermiştir. Literatürde *Trametes versicolor*'dan elde edilen lakkazın farklı moleküllerle beraber renklerinin giderilmesinde asit boyaları (A07 ve AB74) kullanıldığında biyokataliz renk giderme yüzdelerinin diğer reaktif boyaların renk gidermesinden %90 daha fazla etkili olduğu ve *Cerrena unicolor*'dan elde edilen lakkazı Trifenilmetan boyası malahit (bakırtaşı) yeşili, MG' nin 60 C'da renginin giderilmesi çalışmalarında serbest lakkaz ile immobilize lakkaz karşılaştırıldığında immobilize lakkazın önmeli derecede renk giderdiği sonucuna ulaşıldı [79,87].

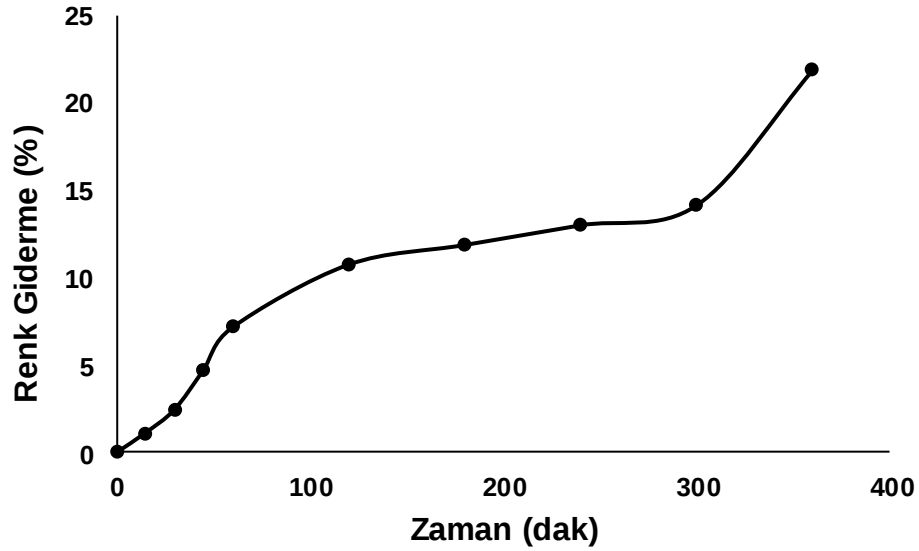
3.12. İmmobilize Enzim İle Metil Oranj Renginin Giderilmesi

3.12.1. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Epiklorhidrin Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz İle Metil Oranj Renginin Giderilmesi

P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkazın metil oranj renk giderilmesi incelenmek için düşük hızda 30°C' da farklı zamanlarda Bölüm 2.13.2' de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorban değişimleri ve renk giderme yüzdeleri Çizelge 3.23 ve Şekil 3.25' de gösterildi.

Çizelge 3.23. P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkaz ile metil oranjin renginin giderilme yüzdeleri

Zaman (dak)	Absorbans (A_{466})	Renk Giderme (%)
0	0,529	0
15	0,523	1,13
30	0,516	2,46
45	0,504	4,73
60	0,491	8,70
120	0,472	10,78
180	0,466	11,91
240	0,460	13,04
300	0,454	14,18
360	0,413	21,93



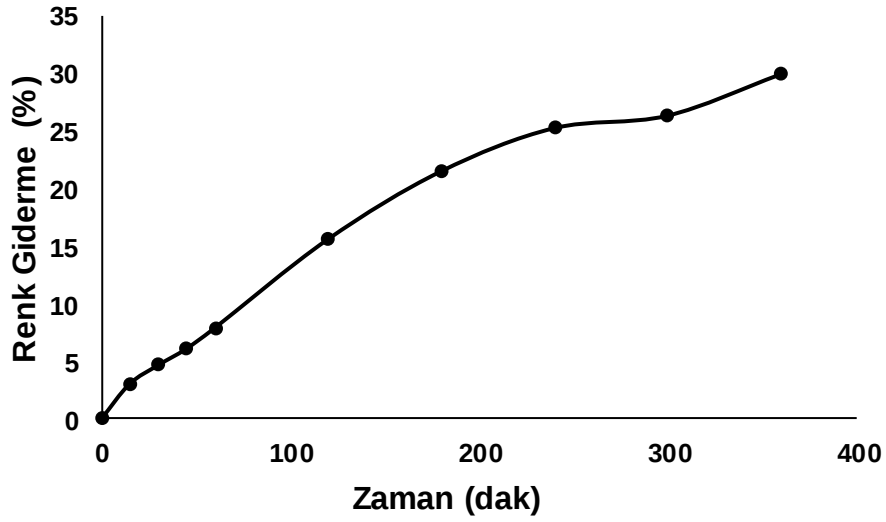
Şekil 3.25. P(AAm-ko-AAc)/ECH hidrojeline immobilize edilen lakkaz ile metil oranjin renginin giderilme yüzdelerinin zamanla değişimi

3.12.2. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/Karbodiimit Hidrojeline İmmobilize Edilen Lakkaz İle Metil Oranj Renginin Giderilmesi

P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkazın metil oranjın renginin giderilmesi incelenmek için düşük hızda 30°C’ da farklı zamanlarda Bölüm 2.13.2’ de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve renk giderme yüzdeleri Çizelge 3.24 ve Şekil 3.26’ da gösterildi.

Çizelge 3.24. P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkaz ile metil oranjın renginin giderilme yüzdeleri

Zaman (dak)	Absorbans (A ₄₆₆)	Renk Giderme (%)
0	0,557	0
15	0,540	3,10
30	0,531	4,67
45	0,523	6,10
60	0,513	12,21
120	0,470	15,62
180	0,437	21,54
240	0,416	25,31
300	0,410	26,39
360	0,390	29,98



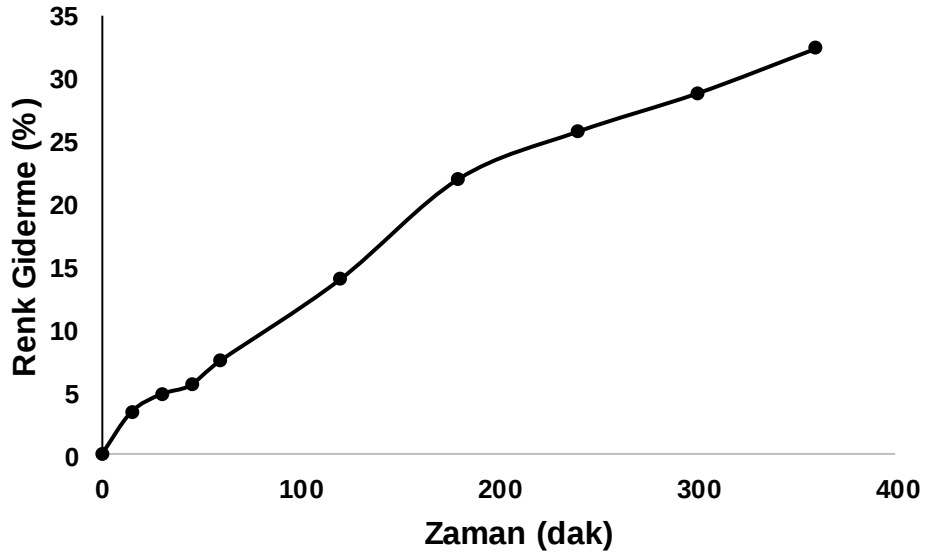
Şekil 3.26. P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojeline immobilize edilen lakkaz ile metil oranjin renginin giderilme yüzdelerinin zamanla değişimi

3.12.3. Poli(akrilamit-ko-akrilik asit)/N-Hidroksisüksinimit Hidrojeline Immobilize Edilen Lakkaz İle Metil Oranj Renginin Giderilmesi

P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkazın metil oranjin renginin giderilmesi incelenmek için düşük hızda 30°C’ da farklı zamanlarda Bölüm 2.13.2’ de anlatıldığı gibi deneyler yapıldı, elde edilen absorbans değişimleri ve renk giderme yüzdeleri Çizelge 3.25 ve Şekil 3.27’ de gösterildi.

Çizelge 3.25. P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkaz ile metil oranjin renginin giderilme yüzdeleri

Zaman (dak)	Absorbans (A ₄₆₆)	Renk Giderme (%)
0	0,558	0
15	0,539	3,41
30	0,531	4,84
45	0,527	5,56
60	0,516	12,01
120	0,468	13,98
180	0,435	22,04
240	0,414	25,81
300	0,397	28,85
360	0,377	32,44



Şekil 3.27. P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojeline immobilize edilen lakkaz ile metil oranjin renginin giderilme yüzdelерinin zamanla değışimi

Şekil 3.25, 3.26 ve 3.27' de görüldüğü gibi 6 saat sonunda P(AAm-ko-AAc)ECH, P(AAm-ko-AAc)CDI ve P(AAm-ko-AAc)NHS hidrojeline immobilize edilen lakkazın metil oranjin rengini giderme yüzdeleri sırasıyla %21, %29 ve %32 oranında olduğu gözlemlendi.



4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında serbest ve immobilize lakkaz enziminin aktivitesine etki eden çeşitli parametrelerin incelenmesiyle elde edilen sonuçlar aşağıda özetlenmiştir.

1. Serbest lakkaz için optimum pH değeri 5,0, P(AAm-ko-AAc)/ECH, P(AAm-ko-AAc)/CDI ve P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojellerine immobilize edilen lakkaz için optimum optimum pH değerleri sırasıyla 5,0, 5,5 ve 5,5 olarak bulundu.
2. Serbest lakkaz için optimum sıcaklık 40°C, P(AAm-ko-AAc)/ECH, P(AAm-ko-AAc)/CDI ve P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojellerine immobilize edilen lakkaz için optimum sıcaklık değeri ise 45°C' a yükselmiştir.
3. Serbest lakkaz için K_m değeri $8,69 \times 10^{-3}$ mM, P(AAm-ko-AAc)/ECH, P(AAm-ko-AAc)/NHS ve P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojellerine immobilize edilen lakkaz için K_m değerleri sırasıyla $0,50 \times 10^{-3}$ mM, $1,17 \times 10^{-3}$ mM ve $7,35 \times 10^{-3}$ mM olarak bulundu.
4. Serbest lakkaz için V_{mak} değeri $7,19 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, P(AAm-ko-AAc)/ECH, P(AAm-ko-AAc)/NHS ve P(AAm-ko-AAc)/CDI hidrojellerine immobilize edilen lakkaz için ise V_{mak} değerleri sırasıyla $0,85 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, $1,45 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹, $4,65 \times 10^{-3}$ mM.dak⁻¹ olarak bulundu.
5. Serbest lakkazın, 4°C' da depolamada 64. günde başlangıç aktifliğinin yaklaşık %29' unu koruduğu gözlemlendi. P(AAm-ko-AAc)/ECH, P(AAm-ko-AAc)/CDI ve P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojellerine immobilize edilen lakkaz için sırasıyla 35. günde %51' ini, 38. günde %66' sını, 37. günde %69' unu koruduğu gözlemlendi.

6. P(AAm-ko-AAc)/ECH, P(AAm-ko-AAc)/CDI ve P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojenlerine immobilize edilen lakkaz için 5 kez kullanımı sonunda başlangıç aktifliklerinin sırasıyla %19 'unu, %52' sini, %17' sini koruduğu bulundu.
7. P(AAm-ko-AAc)/CDI ve P(AAm-ko-AAc)/NHS immobilize lakkazların 40 °C' da inaktivasyon sabitleri sırasıyla 0,0108, 0,0165 ve 50 °C' da inaktivasyon sabitleri sırasıyla 0,0190 ve 0,0252 olarak hesaplandı. İnaktivasyon sabitlerinin immobilize edilmiş lakkazlar için 40 °C' dan 50 °C' a çıkıldıkça arttığı gözlenmiştir.
8. Serbest lakkazın 30°C' da 6 saat sonunda metil oranjın başlangıç rengini %31 oranında giderdiği gözlemlendi. P(AAm-ko-AAc)/ECH, P(AAm-ko-AAc)/CDI, P(AAm-ko-AAc)/NHS hidrojenlerine immobilize edilen lakkazın ise sırasıyla %21, %29 ve %32 oranında giderdiği gözlemlendi.

Epiklorhidrin, karbodiimit ve N-hidroksisüksinimit ile aktifleştirilmiş poli(akrilamit-ko-akrilik asit) hidrojenlerine immobilize edilen lakkaz enzimi, endüstriyel ortamlarda meydana gelen atıkların zehirsizleştirilmesinde ve istenmeyen renklerin giderilmesinde, tekrar kullanımıyla ekonomik yönden alternatif bir arıtma yöntemi olarak kullanılabilir.

KAYNAKLAR

- [1] Qui, Y., Park, K., Environment-sensitive hydrogels for drug delivery, Adv. Drug Deliver.Rev., 53: 321-339, 2001.
- [2] Evcin, A., Polimer Malzemeler, Afyon Üniversitesi, <http://blog.aku.edu.tr/evcin/files/2017/05/10-polimer-uygulamalar%C4%B1-hidrojeller.pdf> (Erişim Tarihi: 03.07.2018)
- [3] Uğurlu, E., Hidrojeller, 2017 <http://www.teksarge.com/2017/04/19/hidrojeller/> (Erişim tarihi: 03.07.2018)
- [4] Swami, S.N., Radiation synthesis of polymeric hydrogels for swelling-controlled drug released studies. Doctor of Philosophy, University of Western Sydney, New South Wales, Australia 120-149, 2004.
- [5] Karlson, P., Gerok, W. and Gross, W., Pathobiochemine. Thiema, Satuttgart, 1978.
- [6] Tüzün, C., Biyokimya. Palme Yayıncılık, Ankara, 2002.
- [7] Kolancı, Ç., Temel ve Klinik Biyokimya. Nobel Tıp Kitapevi, Ankara, 2004.
- [8] Murray, R.K., Granner D.K., Mayes, P.A., Harper'ın Biyokimyası. Menteş, G., Ersöz, B., Barış Kitabevi, Ankara, 1993.
- [9] Kaya, N., Biyokimya. Atatürk Üniversitesi Yayınları, Kars, 1993.
- [10] Öztan, D., Tirosinaz Enziminin Ekstraksiyonu, Saflaştırılması ve Fenollerin Gideriminde Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi. Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 2007.
- [11] Tekman, Ş., Öner, N., Genel Biyokimya. İstanbul Üniversitesi Eczacılık Fakültesi, İstanbul, 47, 1994.
- [12] Onat T., Emerk K., Sözmen, E.Y., İnsan Biyokimyası. Palme Yayıncılık, Ankara, 197-202, 2002.
- [13] Aksoy, C., Yanardağ, R., Lipaz ve Üreaz Enzimlerinin Çeşitli Taşıyıcılara Immobilizasyonu. Yüksek Lisans Tezi. İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 2003.
- [14] Tüzün, C., Biyokimya. Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi, Ankara, 131-133,1997.
- [15] Telefoncu, A., Enzimoloji. Ege Üniversitesi Fen Fakültesi, İzmir, 1-305, 1977.

- [16] Hult K., Berglund, P., Engineered Enzymes for Improved Organic Synthesis. *Curr Opin Biotechnol*, 14 (4): 395–400, 2003.
- [17] Bickerstaff, G.F., Immobilization of Enzymes and Cells. Humana Press, Totowa, New Jersey, 33 : 5-9, 199-205, 1997.
- [18] Zaborsky, O., Immobilized Enzymes. 1-3 CRC Pres, Ohio, 58 : 287- 292, 1974.
- [19] Telefoncu A., İmmobilize Enzimler ve İmmobilizasyon Yöntemleri. Temel ve Uygulamalı Enzimoloji Biyokimya Lisans Üstü Yaz Okulu, İzmir, 193-249, 1986.
- [20] Rempp, P., Merrill, E.W., Polymers, Polymer Synthesis 2nd ed., Hüthig&Wepf Verlag, USA, 331-320, 1991.
- [21] Shan, Y., Shan, D., Immobilized Enzymes; Industrial Biocatalysts. *Indian Journal of Hospital Pharmacy*, 29 (2) : 51-58, 1992.
- [22] Trevon, M.D., Tecniques of Immobilization in Immobilized Enzyme. John Wiley and Sons, New York, 1-11,1985.
- [23] Monsan, P., Combes, D., Enzyme Stabilization by Immobilization Methods in Enzymology. Academic Press, New York, 137, 1988.
- [24] Saburo, F. and Atsuo, T., Application of Biocatalyst Immobilized by Polymer Methods, Enzyme Engineering. Plenum Press, New York, 201-203, 1985.
- [25] Carr, P. W. and Bowers, L. D., Support Considerations in Chemical Analysis, Enzymes. Academic Press, New York, 56: 167-170, 1980.
- [26] Kaetsu, I., Kamura, M. and Yoshida, M., Enzyme Immobilization by Radiation Induced Polymerization of HEMA at Low Temperature. *Biotechnol. Bioeng.*, 21: 847-849, 1979.
- [27] Glick, D., Methods of Biochemical Analysis. Enzyme Immobilization, Academic Press, New York, 25: 135-201, 1979.
- [28] Srere, P. A. and Uyeda, K., Functional Groups on Enzymes Suitable for Binding to Matrices. *Methods in Enzymology*, (Edited by Mosbach, K.), Academic Press, Inc., New York, 44: 11-19, 1976.
- [29] Dumitriu, S., Popa, M. and Dumitriu, M., Polymeric Biomaterials as Enzyme and Drug Carriers. *J. Bioact. Compat. Pol.*, 3: 243-312, 1988.
- [30] Sanjay, G. and Sugunan, S., Enhanced pH and Thermal Stabilities of

Invertase Immobilized on Montmorillonite K-10. Food Chem., 94: 573-579, 2006.

- [31] Gürsel, A., Alkan, S., Toppare, L. and Yağcı, Y., Immobilization of Invertase and Glucose Oxidase in Conducting H-type Polysiloxane/Polypyrrole Block Copolymers. React. Funct. Polym., 57: 57-65, 2003.
- [32] Yildiz, H. B., Kiralp, S., Toppare, L. and Yağcı, Y., Immobilization of Invertase in Conducting Polypyrrole/PMMA-co-PMTM Graft Copolymers. J. Appl. Polym. Sci., 96: 502-507, 2005.
- [33] Chen, S., Liu, Y. and Yu, P., Study on Column Reactor of Chitosan-Immobilized. Chem. Abstr., 127 (4): 127-129, 1996.
- [34] Zaborsky, O., Adsorption Immobilized Enzyme. Ed. by Weast, R. C., CRC Press, Ohio, 75-78, 1973.
- [35] Arica, Y. M. and Hasirci, V. N., Immobilization for the Production of Membranes. Biomaterials, 8: 489-495, 1987.
- [36] Michael, D. T., Immobilized Enzyme Methods in Enzymology. John Wiley and Sons, New York, 80-85, 1980.
- [37] D'Souza, S. F. and Godbole, S. S., Immobilization of Invertase on Rice Husk Using Polyethylenimine. J. Biochem. Bioph. Meth., 52: 59-62, 2002.
- [38] Mosbach, K., Methods in Enzymology. Enzymology, Academic Press, New York, 44-49, 1976.
- [39] Stamets, P., Growing Gourmet and Medicinal Mushrooms 3RD ED., TenSpeed Pres, Berkely, C.A., 382-386, 2000.
- [40] Taylor, P.B., Ashman, S., Baddeley, M.S., Bartram, L.S., Colorimetric Assays for Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by fungal laccases. J Biomol Screen. 7: 537-543, 2002.
- [41] E. Birhanlı, Mikroorganizmaların Lakkaz Üretimine Çeşitli Faktörlerin Etkisi. Yüksek Lisans Tezi. İnönü Üniversitesi, Malatya, 37-44, 2003.
- [42] M. Bayralı, Resorsinol'ün Enzimatik Polimerizasyon Kinetiğinin İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi. Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 37-44, 2003.
- [43] Freire, R.S., Duran, N., Kubota, L.T., Effects of Fungal Laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol. Talanta, 54: 681-686, 2001.

- [44] Duran, N., Rosa, M.A., D'Annibale, A., Gianfreda, L., Applications of Laccases and tyrosinases (phenoloxidases) immobilized on different supports a review. *Enzyme Microb Tech*, 31: 907-931, 2002.
- [45] Quan, D., Shin, W., Modification of electrode surface for covalent immobilization of Laccase. *Mat. Sci. Eng. C-Bios*, 24: 113-115, 2004.
- [46] Cuadrado, M.U., Perez-Juan, P.M., Luque de Castro, D., Gomez-Nieto, M.A., A fully automated method for in real time determination of Laccase activity in wines. *Anal. Chim. Acta*, 553: 99-104, 2005.
- [47] Piontek, K., Biol, J., Crystal Structure of a Laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol.Chem*, 277: 37663-37669, 2002.
- [48] Şolpan, D. and Torun, M., Synthesis and characterization of sodium alginate/acrylamide semi-interpenetrating polymer networks. *J. Appl. Polym. Sci.*, 100: 335-342, 2006.
- [49] Kusuktham, B., Preparation of interpenetrating polymer network gel beads for dye absorption. *J. Appl. Polym. Sci.*, 102: 1585-1591, 2006.
- [50] Ma, J., Xu, Y., Zhang, Q., Zha, L. and Liang, B., Preparation and characterization of pH and temperature-responsive semi-IPN hydrogels of carboxymethyl chitosan with poly (*N*-isopropyl acrylamide) crosslinked by clay. *Colloid Polym. Sci.*, 285: 479-484, 2007.
- [51] Carr, P.W., Bowers, L.D., Support considerations in chemical analysis. *Enzymes*, Academic Press, New York, 56: 167-170, 1980.
- [52] Arda, M., Temel Mikrobiyoloji. Medisan Yayıncılık, Ankara, 46-48, 2000.
- [53] Mittal, A., Malviya, A., Kaur, D., Mittal, J., Kurup, L., Studies on the adsorption kinetics and isotherms for the removal and recovery of Methyl Orange from wastewaters using waste materials. *Journal of Hazardous Materials*, 148 :229-240, 2007.
- [54] Kunamneni, A., Ghazi, I., Camarero, S., Ballesteros, A., Plou, J.F., Alcade, M., Decolorization of synthetic dyes by Laccase immobilized on epoxy-activated carriers. *Process Biochemistry*, 43: 169-178, 2008.
- [55] Lu, L., Zhao, M., Wang, Y., Immobilization of Laccase by alginate-chitosan microcapsules and its use in dye decolorization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23: 159-166, 2007.
- [56] Peralta-Zamora, P., Pereira, C.M., Tiburtius, E.R.L., Moraes, S.G., Rosa, M.A., Minussi, R.C., Duran, N., Decolorization of reactive

- dyes by immobilized laccase. *Applied Catalysis B: Environmental*, 42 :131-144, 2003.
- [57] Zille, A., Laccase Reactions for Textile Applications. Doktora Tezi. Universidade do Minho, Ítalya, 35, 2005.
- [58] Zille, A., Gornacka, B., Rehorek, A., Cavaco-Paulo, A., Degradation of Azo dyes by *Trametes villosa* Laccase over long periods of oxidative conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 71: 6711– 6718, 2005.
- [59] Rogalski, J., Dawidowicz, A.L., Jozwik, E., Leonowicz. A., Immobilization of Laccase from *Cerrena unicolor* on controlled porosity glass. *J. Mol. Catal. B Enzym*, 6: 29-39, 1999.
- [60] Luterek, J., Gianfreda, L., Wojtas-Wasilewska, M., Cho, N., Rogalski, J., Jaszek, M., Malarczyk, E., Staszczak, M., Fink Boots, M., Leonowicz, A., Activity of free and immobilized extracellular *Cerrena unicolor* Laccase in water miscible organic solvents. *Cat. Inist*, 52: 589-595, 1998.
- [61] D'Annibale, A., Stazi, S.R., Vinciguerra, V., Di Mattia, E., Sermanni, G.G., Characterization of immobilized laccase from *Lentinula edodes* and its use in olive-mill wastewater treatment. *Process Biochem*, 34: 697-706, 1999.
- [62] Lante, A., Crapisi, A., Krastanov, A., Spettoli, P., Biodegradation of phenols by Laccase immobilised in a membrane reactor. *Process Biochem*, 36: 51-58, 2000.
- [63] Freire, R.S., Duran, N., Kubota, L.T., Effects of Fungal Laccase Immobilization Procedures for the Development of a Biosensor for Phenol. *Talanta*, 54: 681-686, 2001.
- [64] Al-Adhami, A.J.H., Bryjak, J., Markiewicz, B.G., Chozch, W.P., Immobilization of wood-rotting fungi Laccases on Modified Cellulose and acrylic carriers. *Process Biochem*. 37: 1387-1394, 2002.
- [65] Zille, A., Tzanov, T., Gübitz, G.M., Artur, C.-P., Immobilized Laccase for decolourization of reactive black 5 dyeing effluent. *Biotechnology Letters* 25: 1473–1477, 2003.
- [66] Dodor, D.E., Hwang, H., Ekunwe, S.I.N., Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by immobilized Laccase from *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb Tech*, 35: 210-217, 2004.
- [67] Quan, D., Kim, Y., Shin, W., Sensing characteristics of tyrosinase immobilized and tyrosinase, Laccase co-immobilized platinum electrodes. *Bull. Korean Chem. Soc.* 25 (8): 1195-1201, 2004.

- [68] Dominguez, A., Rodriguez, S., Sanroman, C. and MA. Dye decolorization by *Trametes hirsuta* immobilized into alginate beads. *World Journal of Microbiology&Biotechnology* 21: 405–409, 2005.
- [69] Zawisza, I., Rogalsky, J., Opallo, M., Electrocatalytic reduction of dioxygen by redox mediator and laccase immobilized in silicate thin film. *J Electroanal Chem*, 588: 244-252, 2006.
- [70] Dominguez, A., Gomez, J., Lorenzo, M., Sanroman, A., Enhanced production of laccase activity by *Trametes versicolor* immobilized into alginate beads by the addition of different inducers. *World J Microbiol Biotechnol* 23: 367–373, 2007.
- [71] Champagne, P.P., Ramsay, J.A., Reactive blue 19 decolouration by Laccase immobilized on silica beads. *Appl Microbiol Biotechnol* 77: 819–823, 2007.
- [72] Niladevi, K.N., Prema, p., Immobilization of laccase from *Streptomyces psammoticus* and its application in phenol removal using packed bed reactor. *World J Microbiol Biotechnol* 24: 1215–1222, 2008.
- [73] Fang, H., Huang, J., Ding, L., Li, M., Chen, Z., Preparation of magnetic Chitosan nanoparticles and immobilization of Laccase. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater. Sci. Ed.* Feb. 24 (1), 2009.
- [74] Gökgöz, M., Altinok, H., Immobilization of laccase on polyacrilamide and polyacrilamide-K-carrageenan based semi-interpenetrating polymer networks. *Artificial Cells, Blood Substitutes and Biotechnology*, 40, 326-330, 2012.
- [75] Sanlier, S.H., Gider, S., Köprülü, A., Immobilization of laccase for biotechnology applications. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*, 41, 259-263, 2013.
- [76] Patel, S.K.S., Kalia, V.C., Choi, J., Haw, J., Kim, I., Lee, J.K., Immobilization of laccase on SiO₂ nanocarriers improves its stability and reusability. *J. Microbiol. Biotechnol*, 24(5), 639-647, 2014.
- [77] Ramirez-Montaya, L., Hernandez-Montoya, V., Montes-Moran, M.A., Jauregui-Rincon, J., Cervantes, F.J., Decolorization of dyes with different molecular properties using free and immobilized laccases from *Trametes versicolor*. *Journal of Molecular*, 212, 30-37, 2015.
- [78] Sun, H., Yang, H., Huang, W., Zhang, S., Immobilization of laccase in a sponge-like hydrogel for enhanced durability in enzymatic degradation of dye pollutants. *Journal of Colloid and Interface Science*, 450, 353-360, 2015.
- [79] Zhilin, L., Weiland, S., Wei, L., Hesheng, L., Immobilization of *Agaricus Bisporus* laccase on ceramic-chitosan composite support and their

properties: Potential for oily wastewater treatment. China Petroleum and Petrochemical Technology, 18, 4, 51-60, 2016.

- [80] Dai, J., Wang, H., Chi, H., Wang, Y., Zhao, J., Immobilization of laccase from *pleurotus ostreatus* on magnetic separable SiO₂ support and excellent activity towards azo dye decolorization. Journal of Environmental Chemical Engineering, 4, 2585-2591, 2016.
- [81] Taheran, M., Naghdi, M., Brar, S.K., Knystautas, E.J., Verma, M., surampalli, R.Y., Degradation of chlortetracycline using immobilized laccase on Polyacrylonitrile-biochar composite nanofibrous membrane. Science of the Total Environment, 605-606, 315-321, 2017.
- [82] Apriceno, A., Bucci, R., Girelli, A.M., Immobilization of laccase from *trametes versicolor* on chitosan macrobeads for anthracene degradation. Analytical Letters, 50, 14, 2308-2322, 2017.
- [83] Naghdi, M., Taheran, M., Brar, S.K., Kermanshahi-pour, A., Verma, M., Surampalli, R.Y., Immobilized laccase on oxygen functionalized nanobiochars through mineral acids treatment for removal of carbamazepine. Science of the Total Environment, 584-585, 293-401, 2017.
- [84] Li, G., Nandgaonkar, A.G., Wang, Q., Zang, J., Krause, W.E., Wei, Q., Lucia, L.A, Laccase-immobilized bacterial cellulose/TiO₂ functionalized composite membranes: Evaluation for photo- and bio-catalytic dye degradation. Journal of Membrane, 525, 89-98, 2017.
- [85] Asgher, M., Noreen, S., Bilal, M., Enhancement of catalytic, reusability and long-term stability features of *trametes versicolor* IBL-04 laccase immobilized on different polymers. International Journal of Biological Macromolecules, 95, 54-62, 2017.
- [86] Makas, Y.G. , Kalkan, N.A. , Aksoy, S. Altinok, H. , Hasirci, N. , Immobilization of laccase in k-carragenan based-semi-interpenetrating polymer networks. Journal of Biotechnology 148, 216-220, 2010.
- [87] Yang, J. , Wang, Z. , Lin, J. , Immobilized *cerrena* sp. laccase: preparation, thermal inactivation and operational stability in malachite green decoloration. , Scientific Reports, 7:16429, 10.1038, 41598-017-16771, 2017.
- [88] Asgher, M. , Noreen, S. , Bilal, M. , Enhancing Catalytic functionality of *Trametes versicolor*/ BL-04 laccase by immobilization on chitosan microspheres, Chemical Engineering Research and design, 19, 1-11, 2017

- [89] Magharabi, M. , Nassiri_Koapaei, N. , Bazargi_Kaushalshai, M., Nafissi_Varcheh, N., Bagherzadeh, G. , Faramarzi, M. A., Immobilization of laccase in Aljinate-Gelatine mixed gel and decolorization of synthetic dyes. , Bioinorganik Chemistry and Applications, 82830, 6, 2012

